

**In-vitro-Versuche zum
Metabolismus des Acetaldehyds
im menschlichen Blut**

Vorgelegt

von

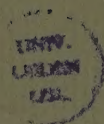
Peter Schleicher

aus

Ebern

*Diss. Erlangen
1983*

1983 № 472



Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

**In-vitro-Versuche zum
Metabolismus des Acetaldehyds
im menschlichen Blut**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Peter Schleicher
aus
Ebern

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. G. Machbert
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.1983

Meiner Frau in Liebe,
meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

A.	EINLEITUNG	1
1.	Problemstellung	2
B.	ALLGEMEINER TEIL	3
1.	Metabolismus von Äthanol und Acetaldehyd	3
1.1	Isoenzyme der ALDH	4
1.2	Hemmung der Isoenzyme der ALDH durch Disulfiram	4
C.	SPEZIELLER TEIL	5
I.	Materialien	5
1.	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	5
1.1	Versuchspersonen	5
1.2	Blutentnahmen	5
2.	Geräte, Chemikalien, Lösungen	6
2.1	Geräte	6
2.2	Kleinmaterial	6
2.3	Chemikalien	6
2.4	Lösungen	7
2.4.1	Acetaldehyd-Stammlösung	7
2.4.2	Innerer Standard	7
II.	Methode	8
1.	Gaschromatographische Acetaldehyd-Bestimmung	8
1.1	Gaschromatographische Bedingungen	8
1.2	Berechnung des Eichfaktors	9
1.3	Berechnung der Acetaldehydkonzentration in den Untersuchungsproben	10
2.	Hämoglobinmessung mit der photometrischen Cyan- Methämoglobinmethode	11
2.1	Prinzip	11
2.2	Probenansatz	11
2.3	Bestimmung und Berechnung	11

	Seite
3. Durchführung der Versuche	12
3.1 Überblick über den Versuchshergang	12
3.2 Kontrollproben	12
3.3 Versuche mit Vollblut	13
3.4 Versuche mit Erythrozyten	13
3.4.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	13
3.4.2 Vorbereitung der Untersuchungsproben	13
3.5 Versuche mit Hämolysat	13
3.5.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	13
3.5.2 Vorbereitung der Hämolysat-Untersuchungsproben	14
3.6 Versuche mit dialysiertem Hämolysat	14
3.6.1 Vorbereitung der Dialyse-Hämolysatproben	14
3.7 Versuche mit dialysiertem Hämolysat unter NAD-Zugabe	14
3.7.1 Herstellung der NAD-Lösung	14
3.7.2 Vorbereitung der mit NAD versetzten Dialyse-Hämolysatproben	15
3.8 Versuche mit Dialyse-Hämolysat unter NAD- und Disulfiramzugabe	15
3.8.1 Herstellung der DisulfiramLösung	15
3.8.2 Vorbereitung der Dialyse-Hämolysat-Proben unter Zusatz von NAD und Disulfiram	15
3.9 Versuche mit Plasma	15
3.9.1 Versuche mit nativem Plasma	15
3.9.2 Versuche mit dialysiertem Plasma	16
III. Ergebnisse	17
1. Kontrollen	17
2. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im Vollblut	18
3. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds in den Erythrozytenproben	23
4. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im nativen Hämolysat	27

5.	Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im Dialyse-Hämolysat	31
6.	Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zusatz	35
7.	Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im Dialyse-Hämolysat nach NAD- und Disulfiramzugabe	39
8.	Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im menschlichen Plasma	43
9.	Übersichten über den ACH-Abfall in den unterschiedlich aufbereiteten Blutbestandteilen	52

D.	DISKUSSION	55
----	------------	----

E.	ZUSAMMENFASSUNG	60
----	-----------------	----

F.	ANHANG	61
----	--------	----

G.	LITERATUR	85
----	-----------	----

A. EINLEITUNG

Acetaldehyd ist das Hauptabbauprodukt im Äthanolmetabolismus. Ein Anstieg der Acetaldehydmenge im Blut nach Gabe von Alkohol ist bereits von STEPP (1920)⁽²⁸⁾, sowie von BALTHAZARD und LAMBERT (1921)⁽²⁾ später auch von SKELTON (1952)⁽²⁷⁾ beschrieben worden.

Eine besondere Bedeutung gewinnt die Bestimmung des Acetaldehydgehalts, seitdem sich der Acetaldehyd (ACH) als wesentlicher Faktor der klinischen Symptomatik nach Alkoholgenuß und erst recht bei Alkoholabusus herauskristallisierte.

Acetaldehyd wird für vielfältige pathologische Vorgänge im menschlichen Körper verantwortlich gemacht. Zu nennen sind z.B. die Wirkung des Acetaldehyds auf den Stoffwechsel, mit Entstehung von Hypoglykämie, Laktazidose, und Hyperurikämie (LIEBER, 1976)⁽²²⁾. Des weiteren sind Schädigungen des Herzmuskels (LIEBER, 1976)⁽²²⁾, sowie Schädigungen des ZNS (HOLTZMANN et al., 1974)⁽¹⁹⁾ und Schädigungen der Leber (LIEBER, 1976)⁽²²⁾, LIEBER, 1975⁽²¹⁾, CEDERBAUM (1975)⁽⁵⁾ beschrieben worden.

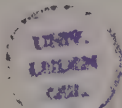
Obwohl der Acetaldehyd immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses bei der Suche nach den Ursachen der Alkoholkrankheit tritt, ist der Metabolismus des Acetaldehyds noch wenig untersucht.

Das liegt vor allem daran, daß die bisherigen Nachweismethoden einen Mangel an Zuverlässigkeit und Genauigkeit zeigen. Am meisten sind davon die älteren Nachweismethoden, wie die Colorimetrie (STOTZ, 1943)⁽²⁹⁾, Spektrophotometrie (BURBRIDGE, 1950)⁽³⁾, radiochemische Methoden (CASIER, 1958)⁽⁴⁾ und enzymatische Methoden (LUNDQUIST, 1958)⁽²³⁾ betroffen. DURITZ und TRUITT (1964)⁽⁷⁾ führten eine gaschromatographische Methode ein, die aber auch noch mit vielen methodischen Mängeln behaftet war.

ERIKSON et al. beschrieb 1977⁽⁹⁾ eine verbesserte gaschromatographische Methode zum Nachweis von Acetaldehyd im biologischen Gewebe. Bei dieser Methode wird die ACH-Konzentration in den einzelnen Proben erst nach Reaktionsabbruch durch Enteiweißung mit 0,6 N Perchlorsäure gemessen.

INOUE et al. (1978)⁽¹⁸⁾ übernahm diese Methode zum Nachweis des Acetaldehyds im menschlichen Blut.

Der Nachteil dieser Nachweismethode ist jedoch, daß bei Anwesenheit von Alkohol in den Proben die Enteiweißung ACH aus Bindungen freigesetzt wird und dadurch nicht nur der ursprünglich freie ACH sondern zusätzlich der normalerweise gebundene Acetaldehyd gemessen wird.^{(8), (30), (32)}



1. Problemstellung

In unseren Versuchen sollte der Abfall des ACH-Gehaltes im Vollblut, Hämolysat, Erythrozyten und Plasma bei niedrigen ACH-Anfangskonzentrationen untersucht werden. Durch die Enteiweißung mit Perchlorsäure, die bei den üblichen gaschromatographischen Methoden üblich ist, kann es zu Fehlern kommen.

Darüberhinaus kommt es durch die während der Equilibrierung verwendeten hohen Temperaturen (ca. 56° C) möglicherweise zu Hitzedenaturierung der Proteine.

Zur Vermeidung dieser Fehler wurde in dieser Arbeit eine neue gaschromatographische Methode angewandt. Mit ihrer Hilfe konnten wir mit physiologischen Equilibrierungstemperaturen arbeiten (38° C) und den ACH-Gehalt der Proben fortlaufend bestimmen, ohne vorher die Proben enteiweißen zu müssen.

B. ALLGEMEINER TEIL

1. Metabolismus von Äthanol und Acetaldehyd

Äthanol wird zu 60 - 80 % in der Leber abgebaut. Nur ein geringer Anteil wird in anderen Organen, insbesondere im Gastrointestinaltrakt metabolisiert. Etwa 1 - 2 % des Äthanols werden direkt über die Nieren, 2 - 3 % über die Lungen und Schweißdrüsen ausgeschieden (13), (11).

Für den Äthanolabbau in der Leber stehen mehrere Enzymsysteme bereit. Dabei spielen die Alkoholdehydrogenase (ADH) und die Aldehyddehydrogenase (ALDH) die wichtigste Rolle. Der Abbau des Äthanols zu Acetaldehyd wird durch die ADH katalysiert. Das Gleichgewicht liegt dabei auf der Seite des Äthanols, sodaß der Abbau zu Acetaldehyd sehr langsam verlief, wenn nicht die ALDH in die Reaktion eingreifen würde (1). Durch die Aktivität der ALDH wird das Gleichgewicht im Äthanolabbau in Richtung Acetaldehyd bzw. Essigsäure verschoben.

Der Hauptabbauort des Acetaldehyds ist die Leber, aber auch in den Erythrozyten, sowie in anderen Organen finden sich Aktivitäten der ALDH.

Sowohl die ADH als auch die ALDH benötigen ein Coenzym, das als Wasserstoffionenakzeptor dient (1). Es handelt sich um das Nikotinadenindinukleotid (NAD), das beim Äthanolabbau in die reduzierte Form, das NADH_2 übergeht. Die Regeneration von NADH_2 zu NAD ist der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der Gesamtreaktion und wahrscheinlich auch der Grund für die zeitlineare Elimination, die sonst in biologischen Systemen nur selten anzutreffen ist (1).

Das Cofaktorensystem NAD/NADH_2 ist nicht nur für den Äthanolabbau, sondern ebenfalls für viele andere essentielle Stoffwechselvorgänge entscheidend.

Unter dem Einfluß von Äthanol und Acetaldehyd kommt es zu einer erheblichen Verminderung des normalerweise hohen NAD/NADH_2 -Quotienten.

Deshalb laufen manche physiologischen Stoffwechselvorgänge, wie z.B. die Umwandlung von Aminosäuren zu Glukose, in der Zelle langsamer oder in eine andere Richtung ab. (22)

Das Endabbauprodukt des Äthanols, die Essigsäure, wird größtenteils in den Zitratzyklus eingeschleußt:



Um die rassisch und individuell unterschiedlich auftretenden Alkoholwirkungen zu erklären, diskutiert man genetisch bedingte Unterschiede in den alkoholabbauenden Enzymen ADH und ALDH.

Besonders die varianten Formen der ALDH rücken heute in den Mittelpunkt des Interesses.

So stellte z.B. HARADA et al. (1980)⁽¹⁷⁾ einen Zusammenhang zwischen der ermittelten Frequenz eines Isoenzym der ALDH und der beobachteten Häufigkeit des Flush-Syndroms in der mongoloiden Bevölkerung fest.

1.1 Isoenzyme der ALDH

HARADA et al. (1978)⁽¹⁵⁾ und GOEDDE et al. (1979)⁽¹⁴⁾ bezeichneten die Isoenzyme der ALDH nach ihren elektrophoretischen Eigenschaften mit ALDH I, ALDH II, ALDH III und ALDH IV.

Nur in der menschlichen Leber und Niere sind alle vier Isoenzyme feststellbar. In den Lymphozyten konnten nur die ALDH I und ALDH II und in den Erythrozyten nur die ALDH II beobachtet werden.

Folgende Michaelis-Konstanten der ALDH-Isoenzyme I-IV wurden von Goedde für Propionaldehyd ermittelt: 0,0035mM, 0,094mM, 0,93mM und 1,4mM. Für NAD fand man die Km-Werte: 0,065mM, 0,024mM, 0,028mM und 0,049mM.

Die Erythrozyten-ALDH, die nach Harada und Goedde mit der ALDH II identisch ist, hat demnach eine relativ niedrige Affinität zu Acetaldehyd, aber eine hohe Affinität zu NAD.

1.2 Hemmung der Isoenzyme der ALDH durch Disulfiram

Disulfiram (Antabus) hemmt die Acetaldehyddehydrogenase, sodaß der Abbau des Äthanol auf der Stufe des Acetaldehyds blockiert wird und der ACH-Spiegel im Blut ansteigt. (6), (24)

Nach Alkoholgenuß kommt es bei Gabe von Disulfiram nach 10 - 30 Minuten zu erheblichen objektiven und subjektiven Störungen: Rötungen des ganzen Körpers besonders des Gesichtes, der Augen und Extremitäten, Übelkeit, Schwindel, Blutdruckabfall, Anstieg der Puls- und Atemfrequenz, Kopfschmerzen, Halsschmerzen und Angst⁽¹²⁾.

HARADA et al. (1980)⁽¹⁶⁾ konnten zeigen, daß Disulfiram vorwiegend das Isoenzym ALDH II hemmt.

Somit bietet Disulfiram eine Möglichkeit ALDH I und ALDH II aufgrund ihrer unterschiedlichen Hemmbarkeit zu unterscheiden.

C. SPEZIELLER TEIL

I. Materialien

1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

1.1 Versuchspersonen

Die Blutproben wurden sechs deutschen Versuchspersonen beiden Geschlechts, im Alter von 21 - 53 Jahren entnommen. Alter, Geschlecht, Körpergewicht, täglich konsumierte Alkoholmenge und Hämoglobingehalt des Blutes der einzelnen Versuchspersonen, sind aus der Tabelle I zu entnehmen:

Tab. I. Alter, Geschlecht, Gewicht, täglicher Alkoholkonsum und Hb-Werte der Versuchspersonen in g:

Versuchspersonen	G.H.	S.S.	M.D.	J.S.	H.L.	P.S.
Alter (Jahre)	25	22	21	52	53	26
Geschlecht	männl.	weibl.	weibl.	weibl.	weibl.	männl.
Körpergewicht (kg)	68	63	57	110	70	72
tägl. Alkoholm. in g	40	10	20	00	10	30
Hb-Wert (g/100 ml)	15,0	12,9	15,8	14,06	13,4	16,05

1.2 Blutentnahmen

Die Blutentnahmen wurden am Vormittag der einzelnen Versuchstage durchgeführt. Zwischen der Blutentnahme und dem letzten Alkoholgenuß sollten mindestens 24 Std. vergangen sein. Ein leichtes, fettarmes Frühstück, etwa zwei Stunden vorher eingenommen, war erlaubt.

Zur Punktion wurde eine Kubital-bzw. Unterarmvene ausgewählt, wobei ein weitleumiges Punktionsbesteck mit einem Überleitungsschlauch verwendet wurde (Blutentnahmebesteck E 1,5 K Biotest GmbH), um Hämolysen weitgehend zu vermeiden. Das Blut wurde in einen Erlenmeyerkolben geleitet, in dem 10 000 E Liquemin/100 ml Blut als Antikoagulantium vorgegeben war.

Pro Versuchsperson entnahmen wir 80 ml Blut. Für Zusatzversuche wurde Konservenblut (ACD) aus der Blutbank verwendet.

2. Geräte, Chemikalien, Lösungen

2.1 Geräte

- Gaschromatograph Perkin Elmer Multifract F-42 mit Trennsäule: 1,5 m Stahlsäule Polyäthylenkol 1500 (15 %) auf Kieselgur 60 - 100 mesh.
- Integrator Hewlett-Packard, Modell 3380 A
- Spektralphotometer Beckman Modell 24
- Zentrifuge Rote-Silenta Hettrich 7000 U/min
- Hochgeschwindigkeitszentrifuge Beckmann Modell J 21 B

2.2 Kleinmaterial

- 20-ml Serumfläschchen mit Gummistopfen und Aluminiumbördel, Verschlußzange
- Meßkolben 100 ml, 1000 ml
- Vollpipetten 0,2 ml; 1 ml; 5 ml; 10 ml
- Kolbenhubpipetten 0,02 ml
- Dialyseschläuche Visking (Serra-Feinbiochemika) Porengröße: 24 Angström

2.3 Chemikalien

- Acetaldehyd p.a. (Merck)
- Iso-Propanol (Merck)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
- Salzsäure p.a. (Merck)
- Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat
- Dinatriumhydrogenphosphat
- Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) (Boehringer Mannheim) (s. S. 14)
- Disulfiram (s. S. 15)
- 2-Mercaptoäthanol (Merck)
- Cyanhämoglobinreagenz (Fa. ASID) (s. S. 11)
- Liquemin (Roche)
- Aceton, p.a. (Merck)

2.4 Lösungen

2.4.1 Acetaldehyd-Stammlösung

Der Acetaldehyd, eine sehr flüchtige Substanz mit einem Siedepunkt von 20,2° C wurde vor jeder Versuchsreihe frisch destilliert. Damit konnte der Fehler, der durch den ACH-Verlust beim Öffnen der Probengefäße auch bei sorgfältigen Arbeiten entsteht, möglichst klein gehalten werden.

Zur Herstellung der Acetaldehyd-Stammlösung wurde eine bestimmte Menge doppelt destillierten Acetaldehyds in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Dazu wählten wir folgendes Verfahren:

Das offene Ende einer 2 ml Glasampulle wurde über dem Bunsenbrenner kapillär etwa 15 cm ausgezogen und anschließend gewogen. Das ausgezogene offene Ende tauchten wir in den doppelt destillierten Acetaldehyd, während die Glasampulle mit Trockeneis stark abgekühlt wurde.

Durch die Abkühlung der sich in der Ampulle befindlichen Luft und dem daraus resultierenden Unterdruck, wurde der Acetaldehyd in die Glasampulle gezogen.

Der in die Ampulle gelangte Acetaldehyd wurde auf der Analysenwaage gewogen. Der Verdunstungsverlust konnte bei diesem Verfahren sehr gering gehalten werden, da der Acetaldehyd sehr stark abkühlt und die Verdunstungsoberfläche durch das kapilläre Ende der Glasampulle sehr klein war.

Die Ampulle gaben wir in einen mit NaCl-Lösung gefüllten Erlenmeyerkolben, zerdrückten sie und füllten mit NaCl-Lösung bis zur 100 ml-Marke auf.

Die somit erhaltene ACH-Stammlösung wurde bei 2° C gut verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt. Aus dieser Stammlösung stellten wir an jedem Versuchstag die benötigten ACH-Standardlösungen neu her.

Die wässrigen Acetaldehydstandardlösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wiesen folgende Konzentration auf:

Standard I	:	11,15	µg/ml
Standard II	:	5,75	µg/ml
Standard II	:	2,29	µg/ml

2.4.2 Innerer Standard

Als Innerer Standard wurde iso-Propanol verwendet. Dazu wurden 0,127 ml der doppelt destillierten Stammlösung in 100 ml NaCl-Lösung gegeben.

2 ml davon wurden dann in 100 ml des jeweiligen ACH-Standards gelöst.

II. Methode

1. Gaschromatographische Acetaldehyd-Bestimmung

1.1 Gaschromatographische Bedingungen

Im Gaschromatographen F 42 der Firma Perkin Elmer lagen folgende Arbeitsbedingungen vor:

Ofen : 70° C

Injektortemperatur : 130° C

Detektortemperatur : 200° C

Wasserbad des Probenwechslers : 38° C

Inkubationszeit der Proben im Wasserbad : 40 min

Trägergas : 30 ml Stickstoff/Minute

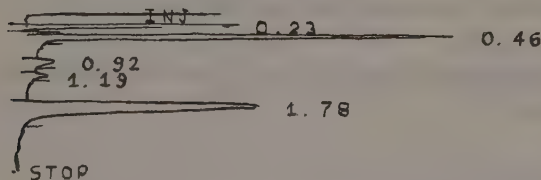
Dosierzeit : 3 sec.

Empfindlichkeit : Range 1/⁶ Attenuation 1

Die Retentionszeit von Acetaldehyd war unter diesen Bedingungen 0,46 min., die von iso-Propanol (Innerer Standard) 1,78 min.

Die folgende Abbildung 1 zeigt ein typisches Gaschromatogramm unter den obigen Bedingungen:

Abb. 1: Typisches Gaschromatogramm: 0,46 = ACH; 1,78 = iso-Propanol



		AREA %	
RT	TYPE	AREA	
.23		2553	8.058
.36	T	202	.637 6
.46	M	20569	64.92
.92		317	1.001
1.19		243	.767
1.78		7798	24.61

HP 3380A
DLY OFF
MY/M .30

STOP OFF
ATTN LOG

REJECT OFF

1.2 Berechnung des Eichfaktors

Als Eichlösungen wurden ACH-Lösungen in den Konzentrationen 11,15 µg/ml, 5,75 µg/ml und 2,79 µg/ml eingesetzt, um etwaige Änderungen des Eichfaktors bei verschiedenen ACH-Konzentrationen zu ermitteln.

Dazu wurden je 0,5 ml der ACH-Lösungen I, II, III (siehe 2.4.1) mit der Kolbenhubpipette in ein Probengefäß pipettiert, in dem 0,5 ml gekühlte NaCl-Lösung und 0,02 µg/ml iso-Propanol als Innerer Standard vorgegeben waren.

Die Probengefäße wurden sofort verschlossen und danach im Wasserbad mindestens 40 min. bei 38° C equilibriert.

Anschließend wurden die darin enthaltenen ACH-Konzentrationen gaschromatographisch analysiert.

Aus den Peakflächen des Acetaldehyds und des Inneren Standards ließ sich, bei bekannten ACH-Konzentrationen, der Eichfaktor f nach folgender Formel berechnen:

$$f = \frac{F_{iso}}{F_{ACH}} \cdot c_{ACH}$$

f = Eichfaktor

F_{iso} = Peakfläche von Isopropanol

F_{ACH} = Peakfläche von ACH

c_{ACH} = ACH-Konzentration in µg/ml

Jede Messung wurde dreifach ausgeführt und aus den ermittelten Werten f der Mittelwert gebildet, nach folgender Formel:

$$f_m = \frac{\sum f_i}{n_i}$$

f_m = Mittelwert aus den Einzelfaktoren

f_i = Einzeleichfaktor

n_i = Anzahl der Einzeleichfaktoren

Die Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert an drei Einzelbestimmungen lagen unter 5 %.

1.3 Berechnung der Acetaldehydkonzentration in den Untersuchungsproben

Die Peakflächen des Acetaldehyds und des Inneren Standards in den Untersuchungsproben wurden gaschromatographisch bestimmt (siehe II.3.). Zusammen mit dem vorher ermittelten Eichfaktor f_m wurden die gesuchten ACH-Konzentrationen in den Untersuchungsproben mit folgender Formel berechnet:

$$c_{ACH} = \frac{F_{ACH}}{F_{iso}} \cdot f_m$$

c_{ACH} = Konzentration von ACH in $\mu\text{g/ml}$

F_{ACH} = Peakfläche von ACH

F_{iso} = Peakfläche von Isopropanol

f_m = Eichfaktor

2. Hämoglobinmessung mit der photometrischen Cyan-Metahämoglobinmethode

2.1 Prinzip

Hämoglobin wird durch Kaliumhexacyanoferrat (III) zu Hämglobin oxidiert, das mit Kaliumcyanid einen stabilen Hämglobincyanidkomplex bildet.

Die Extinktion dieser Verbindung kann photometrisch gemessen werden. Die Hämoglobinbestimmung erfolgte mit dem Cyanhämoglobinreagenz der Firma ASID.

Die Lösung wurde hergestellt, indem der Inhalt eines Fläschchens Trockensubstanz mit Aqua bidest. in einen 1000 ml-Meßkolben gespült wurde. Nach der Zugabe von 2 ml Detergenzlösung wurde der Kolben bis zur Marke aufgefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte in einer braunen Flasche (Lichtschutz).

Das Cyanhämoglobinreagenz enthielt 0,607 mmol/l Kaliumhexacyanoferrat (III) p.a., 0,767 mmol/l Kaliumcyanid p.a. und 11,9 mmol/l Natriumhydrogencarbonat p.a..

2.2 Probenansatz

In ein Reagenzglas pipettierten wir zu 5 ml Cyanhämoglobinreagenz 0,02 ml Blut (bzw. Erythrozytensuspension oder Hämolysat). Die Probe blieb 20 Minuten stehen, dann konnte der Hämoglobingehalt bestimmt werden.

Die Ansätze wurden dreifach ausgeführt.

2.3 Bestimmung und Berechnung

Die Bestimmung erfolgte mit einem Photometer der Firma Beckman Model 24, bei einer Wellenlänge von 540 nm, gegen Cyanhämoglobinreagenz als Leerwert.

Die Hb-Konzentration wurde über folgende Formel errechnet:

$$c_{\text{Hb}} = \frac{E}{36,8}$$

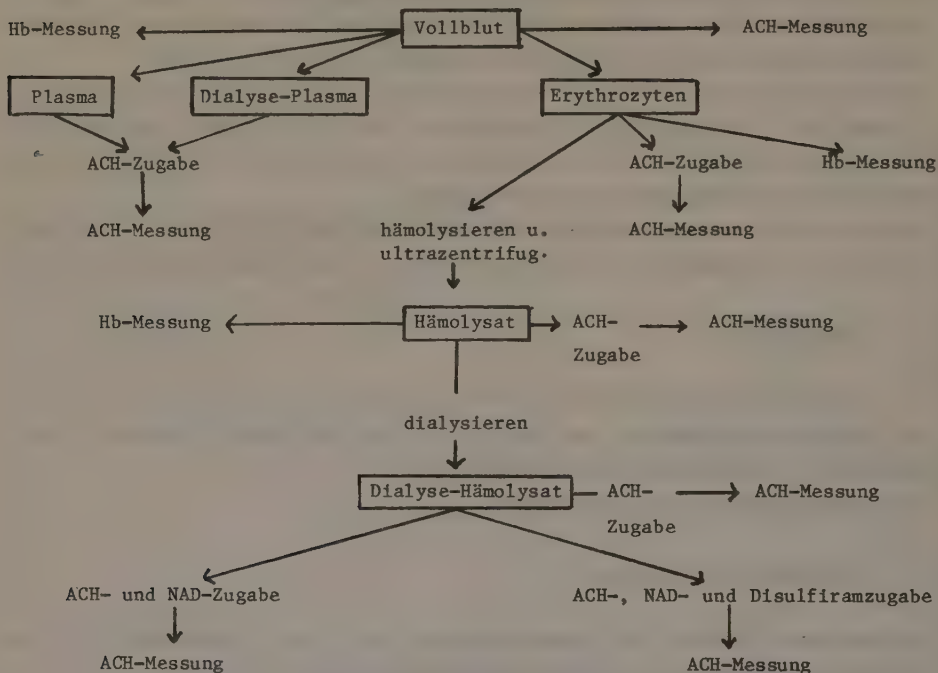
$$c_{\text{Hb}} = \text{Hb-Konzentration in g Hb/100 ml}$$

$$E = \text{Extinktion der Probe}$$

3. Durchführung der Versuche

3.1 Überblick über den Versuchshergang

Das folgende Blockschema gibt einen Überblick über den Ablauf der Versuche:



3.2 Kontrollproben

Um die Dichtigkeit der Probengefäße zu prüfen und den damit zusammenhängenden Schwund des Acetaldehyds aus den Probengefäßen zu ermitteln, wurden bei den Versuchen Kontrollen mitgeführt.

Die Kontrollproben bestanden aus 1 ml isotonischer NaCl-Lösung, die 11,15 µg/ml ACH und den Inneren Standard enthielten.

3.3 Versuche mit Vollblut

Unmittelbar nach der Blutentnahme und der Bestimmung des Hb-Gehaltes, versetzten wir 0,5 ml Vollblut mit 0,5 ml NaCl-Lösung, die 11,15 µg/ml eisgekühlten Acetaldehyd und 0,02 µg/ml Isopropanol als Inneren Standard enthielt. Die Probengefäße wurden sofort verschlossen und gleichzeitig in das 38° C warme Wasserbad des Probenwechslers eingesetzt.

Nach einer Inkubationszeit von 45 min. wurden die ACH-Konzentrationen in den Proben über einen Zeitraum von 165 min. im Abstand von 20 min. gemessen.

3.4 Versuche mit Erythrozyten

3.4.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

75 ml des Vollbluts zentrifugierten wir 20 min. lang bei 4000 x g und trennten das Plasma ab. Der über der Erythrozytenschicht liegende "buffy-coat", wurde mit der Wasserstrahlpumpe entfernt, die Erythrozyten mit isotonischem NaCl-Tris-Puffer (145 mM NaCl, 10 mM Tris/HCL ph 7,4) etwa 1:1 vermischt und wieder ca. 20 min. bei 4000 x g zentrifugiert. Diesen Waschvorgang wiederholten wir dreimal. Danach wurde die Erythrozytensuspension mit der NaCl-Pufferlösung auf den Hb-Wert von 5 - 6 g/100 ml eingestellt.

3.4.2 Vorbereitung der Untersuchungsproben

0,5 ml der Erythrozytensuspension wurden mit 0,5 ml NaCl-Lösung, die 11,15 µg/ml ACH und 0,1 % Isopropanol als Inneren Standard enthielt, versetzt.

Sieben Proben wurden hergestellt und gleichzeitig in das 38° C warme Wasserbad des automatischen Probenwechslers eingesetzt. Nach der Inkubationszeit von 50 min. wurden die Proben dann fortlaufend über einen Zeitraum von insgesamt 170 min. auf ihren ACH-Gehalt hin untersucht.

3.5 Versuche mit Hämolysat

3.5.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Die gewaschenen Erythrozyten hämolysierten wir durch Zugabe von 4 Teilen destillierten Wassers zu der Erythrozytensuspension. Nach der Ultrazentrifugation über 40 min. bei 27 000 x g wurde der stromafreie Überstand abgehoben und mit 15 mM Na-P-Puffer ph 7,4 auf einen Hb-Wert von 5 - 6 g Hb/100 ml eingestellt.

3.5.2 Vorbereitung der Hämolysat-Untersuchungsprobe

Unmittelbar nach der Zentrifugation wurden sieben Hämolysat-Proben mit 11,15 µg/ml ACH und dem Inneren Standard versetzt und gleichzeitig in das 38° C warme Wasserbad eingesetzt. Nach der Inkubationszeit von 55 min. wurden die Proben in einem Zeitabstand von 20 min. gemessen.

Der Gesamtmeßzeitraum war 175 min..

3.6 Versuche mit dialysiertem Hämolysat

Um das NAD weitgehend aus dem Hämolysat zu entfernen, dialysierten wir das stroma-freie Hämolysat über 20 Stunden gegen einen 15 mM Na-P-Puffer pH 7,4, dem zur Stabilisierung der Enzyme 0,1 % Mercaptoäthanol hinzugefügt wurde.

Das Hämolysat wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und in 500 ml der Pufferlösung gehängt. Mit einem Magnetrührer hielten wir die Dialyseflüssigkeit ständig in Bewegung, um eine optimale Gleichgewichtseinstellung zu gewährleisten.

3.6.1 Vorbereitung der Dialyse-Hämolysat-Proben

Entsprechend den anderen Versuchen, wurde ACH und der Innere Standard den Proben zugegeben. Der Meßabstand wurde so gewählt, daß die ACH-Abnahme über einen Zeitraum von 175 min. beobachtet werden konnte.

3.7 Versuche mit dialysiertem Hämolysat unter NAD-Zugabe

Zur Prüfung der NAD-Abhängigkeit des ACH-Schwundes in den Hämolysatproben, gaben wir den Dialyse-Hämolysat-Proben, die weitgehend von NAD befreit waren, eine 24 mmol/l NAD-Lösung zu.

3.7.1 Herstellung der NAD-Lösung (1mM)

Der Inhalt eines Fläschchens NAD-Trockensubstanz (Boehringer Mannheim, Test-Kombination: Blutalkohol) wurde in 3 ml Aqua bidest. aufgelöst. Diese Lösung wies eine Konzentration von 24 mmol/l auf und war bei 4° C etwa vier Wochen haltbar (Angaben von Boehringer). Aus dieser NAD-Stammlösung bereiteten wir an jedem Versuchstag die benötigte 1 mM NAD-Lösung zu, indem wir 0,416 ml der NAD-Stammlösung in NaCl-Lösung, die ACH und den Inneren Standard enthielt, gaben.

3.7.2 Vorbereitung der mit NAD versetzten Dialyse-Hämolysat-Proben

0,5 ml der oben beschriebenen ACH, Innerer Standard und NAD enthaltenden Lösung, wurden mit 0,5 ml der dialysierten Hämolysat-Probe vermischt.

Nach der Inkubationszeit von 55 min. im 38° C warmen Wasserbad des automatischen Probenwechslers, wurden die Proben fortlaufend analysiert. Den Abstand zwischen den Messungen wählten wir so, daß die ACH-Konzentrationsabnahme über einen Zeitraum von 170 min. beobachtet werden konnte.

3.8 Versuche mit Dialyse-Hämolysat, unter NAD- und Disulfiramzugabe

Das in den Erythrozyten vorkommende ALDH-Isoenzym II, läßt sich gut durch Disulfiram hemmen. ⁽¹⁶⁾

Daher schien uns Disulfiram zur Charakterisierung dieses Isoenzymen geeignet. In unserem Versuch setzten wir dem dialysierten Hämolysat zusätzlich zu der NAD-Lösung eine 5 µM Disulfiram-Lösung zu.

3.8.1 Herstellung der Disulfiram-Lösung

15 mg der Disulfiram-Trockensubstanz wurden in 10 ml Aceton gelöst. An jedem Versuchstag versetzten wir 10 ml einer NaCl-Lösung, die 11,15 µg/ml ACH, Inneren Standard und 1 mM NAD-Lösung enthielt, mit 10 µl der Disulfiram-Stammlösung.

3.8.2 Vorbereitung der Dialyse-Hämolysat-Proben unter Zusatz von NAD und Disulfiram

In einem Probenglas vermischten wir 0,5 ml der oben beschriebenen ACH, Inneren Standard, NAD und Disulfiram enthaltenden Lösung, mit 0,5 ml des dialysierten Hämolysats, und analysierten entsprechend den anderen Proben den ACH-Abfall über 150 min.

3.9 Versuche mit Plasma

3.9.1 Versuche mit nativem Plasma

Nach dem Abtrennen des Plasmas von den Erythrozyten wurden 0,5 ml des Plasmas mit 0,5 ml einer NaCl-Lösung versetzt, die ACH und Inneren Standard enthielt.

Die ACH-Anfangskonzentration betrug 11,15 µg/ml.

Sieben gleichartige Proben wurden hergestellt, gleichzeitig bei 38° C in das Wasserbad eingesetzt und nach der Inkubationszeit alle 20 Minuten, über einen Zeitraum von 160 min., analysiert.

3.9.2 Versuche mit dialysiertem Plasma

Zur Klärung des Einflusses niedermolekularer Stoffe auf den ACH-Schwund im Plasma, dialysierten wir das Plasma 20 Stunden gegen einen 15 mM Na-P-Puffer pH 7,4 (siehe auch II. 5.).

Die ACH-Abnahme in den Proben wurde dann, wie in II. 8.1 beschrieben, analysiert, nachdem ACH und der Innere Standard zugefügt worden war.

III. Ergebnisse

1. Kontrollen

Die ACH-Analyse in den Kontrollproben (siehe II. 3.2) ergab einen ACH-Schwund von maximal 5 %, d.h. die ACH-Konzentration fiel aufgrund von Undichtheiten an den Probengefäßen innerhalb 185 min. von 11,15 µg/ml auf nur 10,64 µg/ml ab (siehe Tab. 1 und Abb. 2).

Man kann daher annehmen, daß die Fehlerquote durch ACH-Schwund in unseren Versuchen unter 5 % liegt.

Die Meßwerte der ACH-Kontrollproben können der folgenden Tabelle 1 entnommen werden:

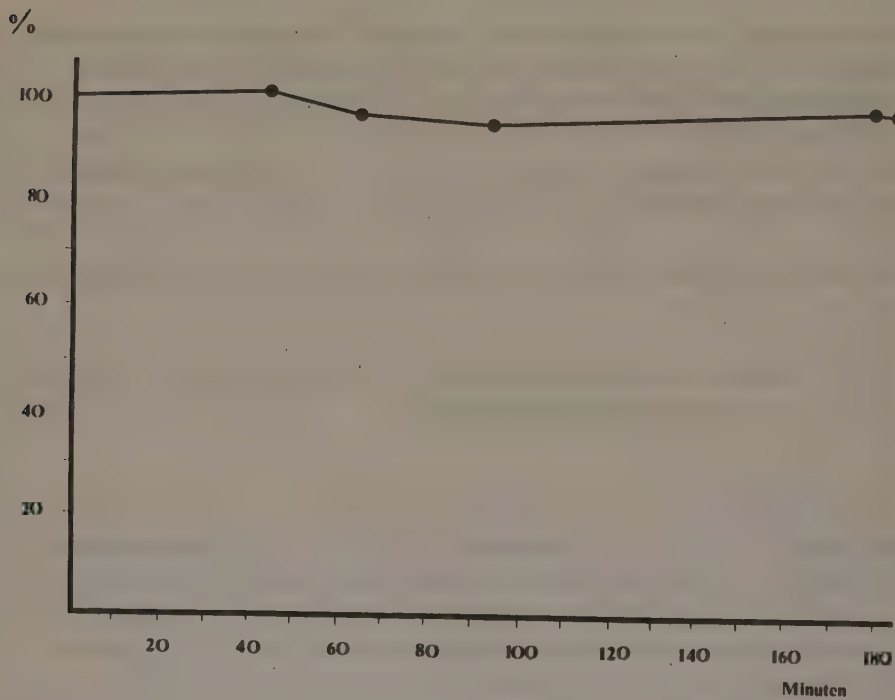
Tab. 1: Meßwerte der ACH-Konzentration in den Kontrollproben, in ACH µg/ml und in % der ACH-Anfangskonzentration:

Zeit (min)	ACH- µg/ml	% der ACH-Anfangskonz.
0	11,15	100
45	11,45	102,76
65	10,76	96,41
95	10,56	94,74
180	10,80	96,89
180	10,83	97,14
185	10,77	96,60
185	10,64	95,42

Abb. 2 ACH-Abfall in % der zugesetzten Menge.

Ordinate: ACH-Konzentration in % der Anfangskonzentration

Abszisse: Zeit in Minuten



2. Abfall des in- vitro zugesetzten Acetaldehyds im Vollblut

Den Vollblutproben von sechs Versuchspersonen wurden 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugemischt. Der Hb-Gehalt der Proben lag zwischen 12,9 und 16,05 g/l. Der ACH-Gehalt der Blutproben bezogen auf g/Hb lag demnach zwischen 1,53 µm/gHb und 1,96 µm/gHb.

Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 38° C erfolgte die erste Messung der Acetaldehydgehalte. Die weiteren Untersuchungen wurden in Abständen von 20 Minuten durchgeführt.

In allen Blutproben fand sich nach 45 Minuten ein rascher Abfall des Acetaldehydgehaltes von 11,15 µg/ml auf 5,54 µg/ml bis 2,50 µg/ml, entsprechend einem Abfall pro Minute von durchschnittlich 0,154 µg/ml in diesem Zeitabschnitt.

Der weitere Kurvenverlauf zeigt in allen Blutproben ein langsames Absinken der Acetaldehydgehalte auf 3,73 µg/ml bis 0,88 µg/ml nach 85 Minuten, auf 2,47 µg/ml bis 0,74 µg/ml nach 125 Minuten, um bei Versuchsende (165 min.) auf 1,80 µg/ml bis 0,29 µg/ml abzusinken.

Daraus läßt sich der ACH-Abbau pro Minute während der einzelnen Meßabschnitte berechnen:

Zwischen den Meßpunkten 45 und 85 Minuten ergab sich ein durchschnittlicher ACH-Abbau pro Minute von 0,045 µg/ml, zwischen den Meßpunkten 85 Minuten und 125 Minuten ein ACH-Abbau pro Minute von 0,018 µg/ml und zwischen dem Meßpunkt 125 Minuten und Versuchsende ein durchschnittlicher ACH-Abbau von 0,010 µg/ml/Minute.

In Abbildung 3 ist der Acetaldehydabfall in den Vollblutproben von sechs Personen in µg/ml zusammenfassend dargestellt.

Berücksichtigt man den in den einzelnen Blutproben vorliegenden Hb-Gehalt, so ergibt sich eine bessere Übereinstimmung in der stündlichen Abnahmerate des Acetaldehydgehalts.

Abb. 3 Vollblut: Acetaldehydverlaufskurven von 6 Vp.

Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$

Abszisse: Zeit in Minuten

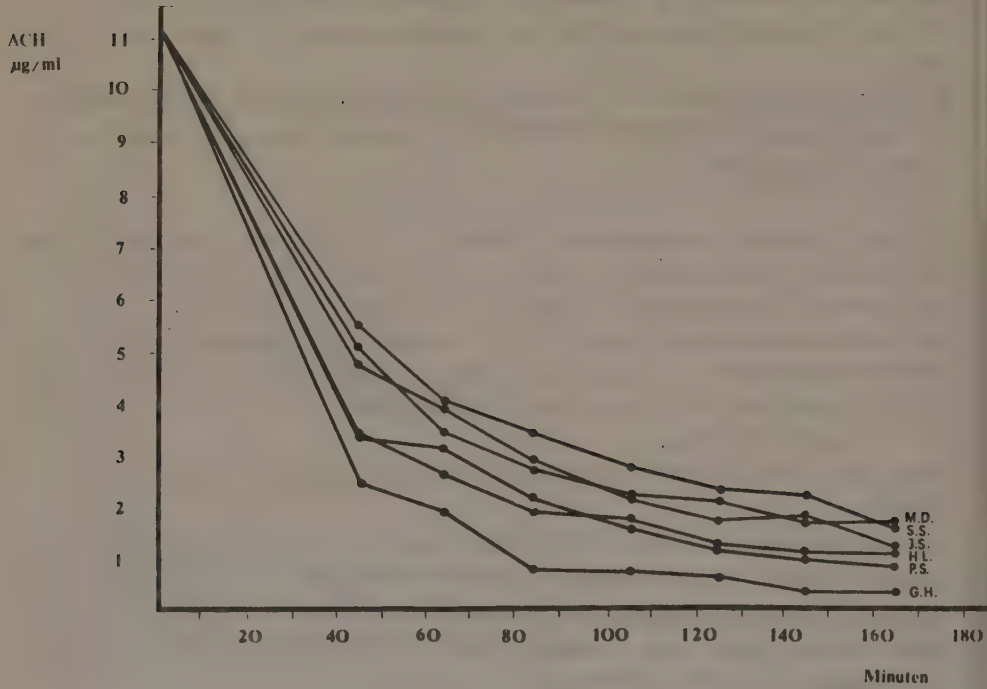
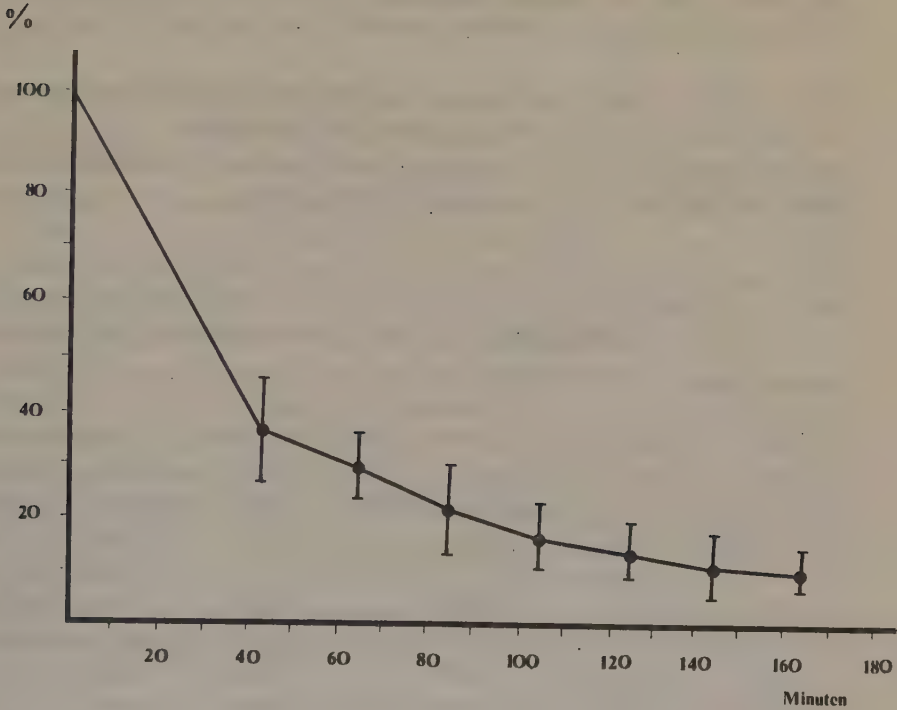


Abb. 4 Vollblut: Acetaldehydverlaufskurve in % der zugesetzten Menge.
Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonz.
Abszisse: Zeit in Minuten
● Mittelwerte
I Standardabweichungen



In Prozent ausgedrückt ergab sich bei den sechs Versuchspersonen innerhalb der Inkubationszeit ein Abfall der ACH-Konzentration auf 38 %. Danach fiel die Konzentration des Acetaldehyds langsamer ab und näherte sich am Ende der Versuchsdauer einem Gleichgewichtswert, der bei durchschnittlich 10 % der Anfangskonzentration lag.

Abbildung 4 zeigt den Acetaldehydabfall in % der Acetaldehydanfangskonzentration. Die Standardabweichungen schwankten zwischen 10,19 % und 4,83 %.

In der Tabelle 2 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Range des prozentualen Abfalles der Acetaldehydkonzentration dargestellt.

Die Einzelmeßwerte der ACH-Konzentration in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$ können den Tabellen Ia - If im Anhang entnommen werden.

Tab. 2 Vollblut: Mittelwerte (x), Standardabweichungen (s) und Range (r) der ACH-Meßwerte in % der ACH-Anfangskonzentration von sechs Versuchspersonen:

Zeit in min.	x	s	r
0	100	-	-
45	37,65	10,19	49,49 - 22,42
65	29,02	6,72	36,50 - 18,12
85	21,92	8,65	30,22 - 7,89
105	17,74	5,98	24,48 - 7,44
125	25,43	5,16	22,15 - 6,64
145	13,35	6,35	20,90 - 2,51
165	12,28	4,83	16,14 - 3,60

3. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds in den Erythrozytenproben

Den gewaschenen buffy-coat-freien Erythrozytenproben von sechs Versuchspersonen wurden 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugegeben. Die ACH-Konzentration in den Proben lag zwischen 4,56 und 7,59 g/100 ml.

Der Acetaldehydgehalt der Erythrozytenproben bezogen auf gHb lag zwischen 3,32 µM/gHb und 5,55 µM/gHb.

Nach der Inkubationszeit von 50 Minuten erfolgte die erste Messung der ACH-Gehalte und dann jeweils im Abstand von 20 Minuten.

Auch hier war, wenn auch im geringeren Umfang als in den Vollblutproben, ein rascher Abfall der ACH-Konzentrationen schon während der Inkubationszeit von 50 Minuten zu verzeichnen. Der ACH-Gehalt fiel von 11,15 µg/ml auf 7,29 bis 5,70 µg/ml in diesem Zeitabschnitt. Das entspricht einem ACH-Abfall pro Minute von durchschnittlich 0,095 µg/ml.

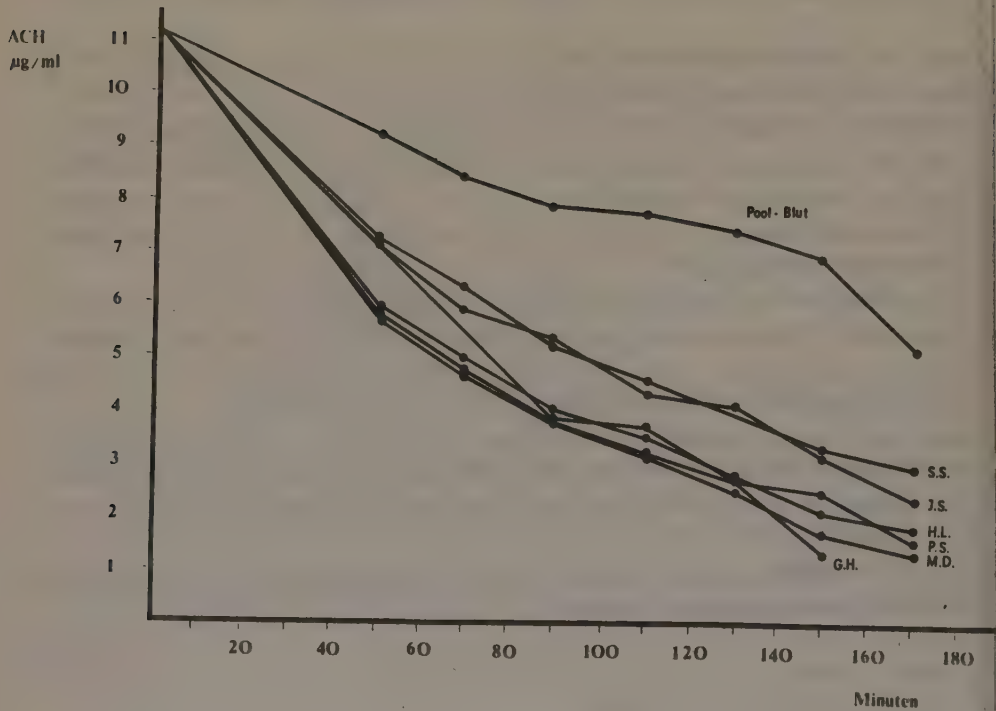
Im weiteren Verlauf der Kurve zeigte sich ein langsamerer Schwund des Acetaldehyds. Nach 90 Minuten war der Acetaldehydgehalt in den Proben der sechs Versuchspersonen auf 5,37 bis 3,76 µg/ml, nach 130 Minuten von 4,03 bis 2,50 µg/ml und bei Versuchsende (140 Minuten) auf 2,96 bis 1,42 µg/ml abgesunken.

Das ergibt einen ACH-Abbau pro Minute von durchschnittlich 0,049 µg/ml zwischen den Meßpunkten 50 und 90 Minuten, einem Abbau pro Minute von 0,029 µg/ml zwischen den Meßpunkten 90 und 130 Minuten und einem Abbau pro Minute von 0,033 µg/ml bis zum Versuchsende.

In der Abbildung 5 ist der Acetaldehydabfall in den Erythrozytenproben von sechs Versuchspersonen in µg/ml dargestellt.

Die Kurve der aus Blutbankblut gewonnenen Erythrozyten-Proben fällt deutlich aus der Schar der anderen Kurven heraus.

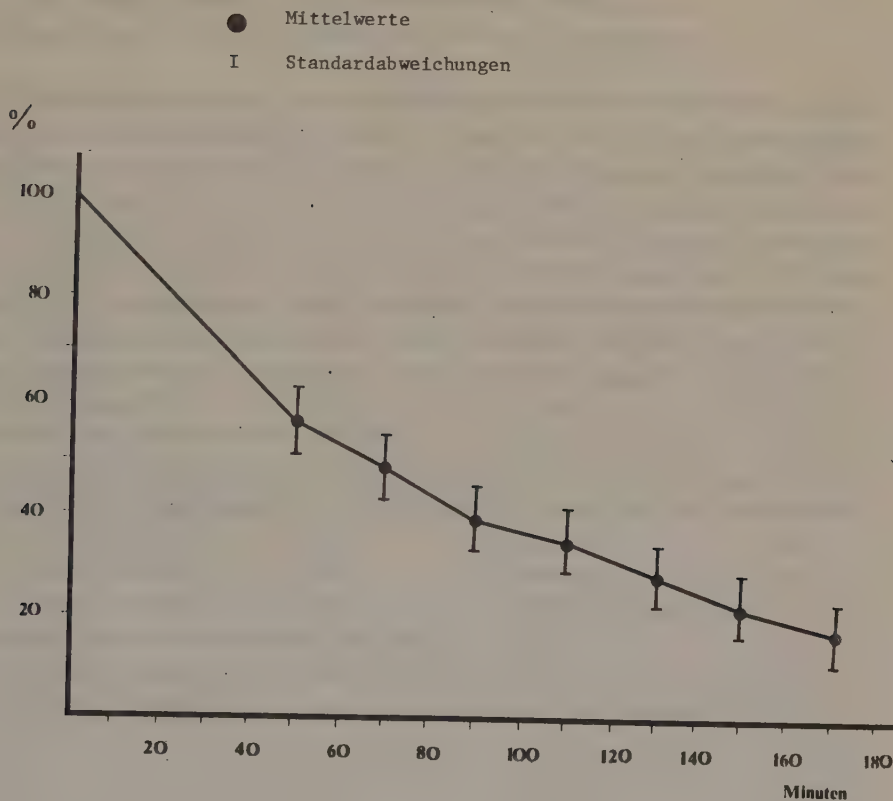
Abb. 5 Erythrozyten: ACH-Verlaufskurven von 6 Vp.
Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
Abszisse: Zeit in Minuten



In Prozent der ACH-Anfangskonzentration ausgedrückt sind in den Erythrozytenproben nach der Inkubationszeit von 50 Minuten im Durchschnitt noch 57 % enthalten. Dieser ACH-Gehalt fällt bis zum Ende der Versuchszeit noch auf 18,9 % ab. Die Standardabweichungen schwankten zwischen 7,01 % und 5,58 %.

Abbildung 6 zeigt den Acetaldehydabfall in den Erythrozyten-Proben von sechs Versuchspersonen in % der ACH-Anfangskonzentration.

Abb. 6 Erythrozyten: ACH-Verlaufskurve in % der zugesetzten Menge.
Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonz.
Abszisse: Zeit in Minuten



In der Tabelle 3 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Range des prozentualen Abfalls der ACH-Konzentration dargestellt.

Die Einzelmeßwerte der ACH-Gehalte in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$, ACH $\mu\text{M/gHb}$ können der Tabelle IIa - II f im Anhang entnommen werden.

Tab. 3 Erythrozyten: Mittelwerte (x), Standardabweichungen (s) und Range (r) der ACH-Meßwerte in % der ACH-Anfangskonzentration von sechs Versuchspersonen (ohne Blutbankblut):

Zeit in (min.)	x	s	r
0	100	-	-
50	57,34	6,73	65,38 - 51,12
70	47,14	7,01	56,59 - 41,26
90	38,75	6,95	48,16 - 29,42
110	34,77	6,59	43,50 - 28,25
130	26,43	6,07	36,14 - 22,42
150	23,03	6,72	32,91 - 14,89
170	18,86	5,58	26,55 - 12,74

4. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im nativen Hämolsat

Den Hämolsatproben von sechs Versuchspersonen wurde 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugegeben.

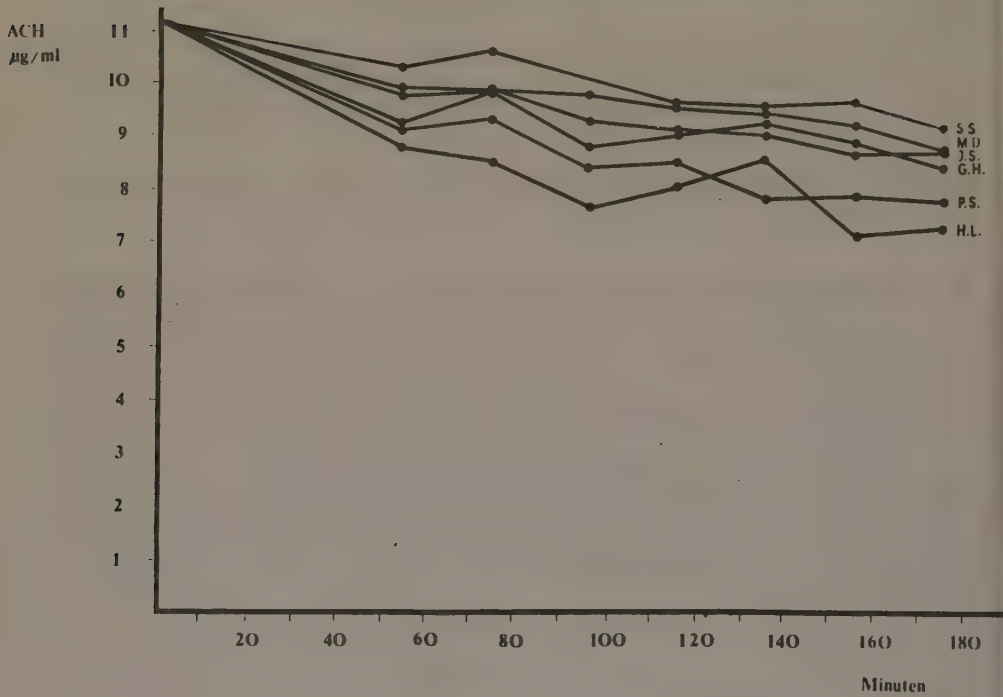
Der Hb-Gehalt der Hämolsatproben lag zwischen 4,2 g Hb/100 ml und 7,06 gHb/100 ml. Der ACH-Gehalt bezogen auf gHb lag damit zwischen 3,57 µM/gHb und 6,23µM/gHb.

Nach einer Inkubationszeit von 55 Minuten erfolgte die erste Messung. Die nachfolgenden Messungen wurden im Abstand von 20 Minuten durchgeführt.

In den Hämolsatproben der sechs Versuchspersonen ergab sich ein sehr langsamer Abfall des Acetaldehydgehaltes von 11,15 µg/ml auf 10,20 µg/ml bis 8,89 µg/ml während der Inkubationszeit von 55 Minuten. Nach 95 Minuten Versuchszeit fiel die Konzentration auf 9,79 µg/ml bis 7,67 µg/ml, nach 135 Minuten auf 9,63 bis 7,79 µg/ml um bei Versuchsende (175 min.) auf 9,27 bis 7,06 µg/ml abzufallen. Das entspricht einem durchschnittlichen ACH-Abfall pro Minute von 0,030 µg/ml während der Inkubationszeit, einem durchschnittlichen ACH-Abfall pro Minute von 0,009 µg/ml zwischen den Meßpunkten 55 und 95 Minuten, von 0,002 µg/ml zwischen den Meßpunkten 95 und 135 Minuten und von 0,018 µg/ml zwischen dem Meßpunkt 135 und Versuchsende.

In der Abbildung 7 ist der ACH-Abfall in den Hämolsat-Proben von sechs Versuchspersonen in µg/ml dargestellt.

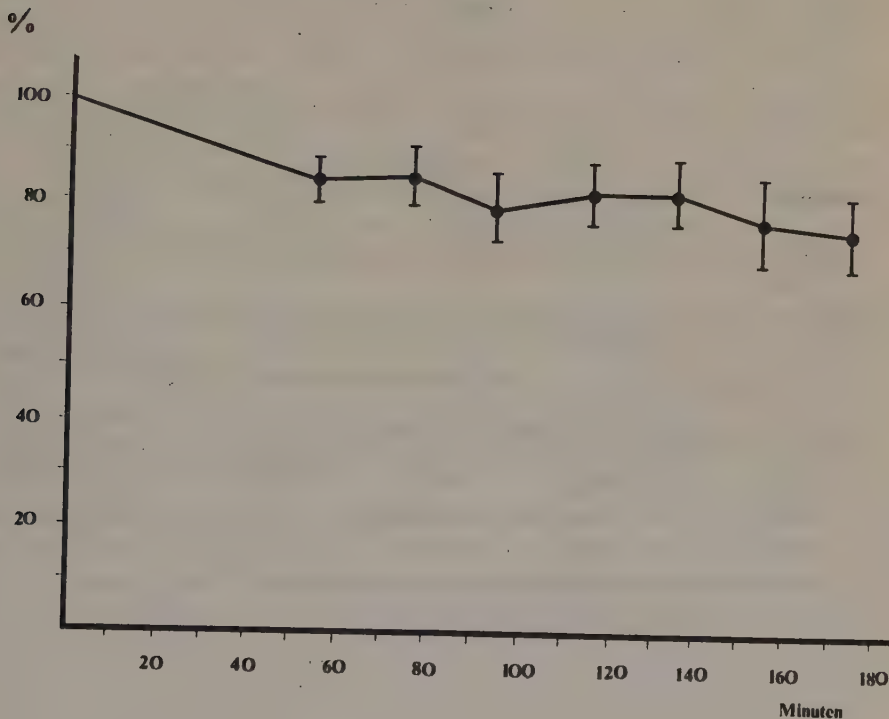
Abb. 7 Hämolysat: ACH-Vorlaufskurven von 6 Vp.
Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
Abszisse: Zeit in Minuten



In Prozent der ACH-Anfangskonzentration ausgedrückt, fanden sich bei den sechs Versuchspersonen nach der Inkubationszeit von 55 Minuten im Mittel noch 85 % der Anfangskonzentration. Am Ende der Versuchszeit von 175 lag der ACH-Gehalt immer noch bei 74 % (siehe Abb. 8). Die Standardabweichungen schwankten zwischen 8,52 und 4,65 %.

Abb. 8 Hämolysat: ACH-Verlaufskurve in % der zugesetzten Menge.
Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonz.
Abszisse: Zeit in Minuten

● Mittelwerte
I Standardabweichungen



In Tabelle 4 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Range des prozentualen Abfalls der ACH-Konzentration aufgezeigt.

Die Einzelmeßwerte der ACH-Gehalte in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$, ACH $\mu\text{M/gHb}$ können den Tabellen IIIa - IIIf entnommen werden.

Tab. 4 Hämolysat: Mittelwerte (x), Standardabweichungen (s) und Range (r) in % der ACH-Anfangskonzentration von sechs Versuchspersonen

Zeit in (min.)	x	ACH/min	s	r
0	100	-	-	-
55	85,38	0,27	4,65	91,48 - 79,73
75	86,22	- 0,04	7,01	56,59 - 41,26
95	79,14	0,35	7,04	87,80 - 68,79
115	80,82	0,08	6,23	87,35 - 71,12
135	80,25	0,03	5,85	86,37 - 77,85
155	76,13	0,21	8,52	86,55 - 62,24
175	74,30	0,09	7,23	83,14 - 63,32

5. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im Dialysehämolysat

Nach der Dialyse des Hämolysats von fünf Versuchspersonen, wurde den Proben 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugesetzt.

Der Hb-Gehalt und der ACH-Gehalt bezogen auf gHb entsprach den Werten im undialysierten Hämolysat.

Nach der Inkubationszeit von 55 Minuten bei 38° C erfolgte die erste Messung der Acetaldehydgehalte. Die weiteren Untersuchungen wurden im Abstand von 20 Minuten durchgeführt.

In den Proben ergab sich nach 55 Minuten ein langsamer Abfall der Acetaldehydgehalte von 11,15 µg/ml auf 11,14 µg/ml bis 9,31 µg/ml. Der geringe ACH-Abfall setzte sich auch im weiteren Versuchsverlauf fort. Nach 95 Minuten fand sich ein Abfall der ACH-Gehalte auf 10,01 bis 8,07 µg/ml, nach 135 Minuten auf 9,48 bis 8,00 µg/ml um bei Versuchsende (175 min.) auf 9,54 bis 7,87 µg/ml abzusinken. Das entspricht während der Inkubationszeit einem durchschnittlichen ACH-Abfall pro Minute von 0,019 µg/ml, zwischen den Meßpunkten 55 Minuten und 95 Minuten einem durchschnittlichen ACH-Abfall pro Minute von 0,026 µg/ml, zwischen den Meßpunkten 95 und 135 Minuten einem durchschnittlichen ACH-Abfall pro Minute von 0,005 µg/ml und zwischen 135 und 175 Minuten einem durchschnittlichen ACH-Abfall pro Minute von 0,002 µg/ml.

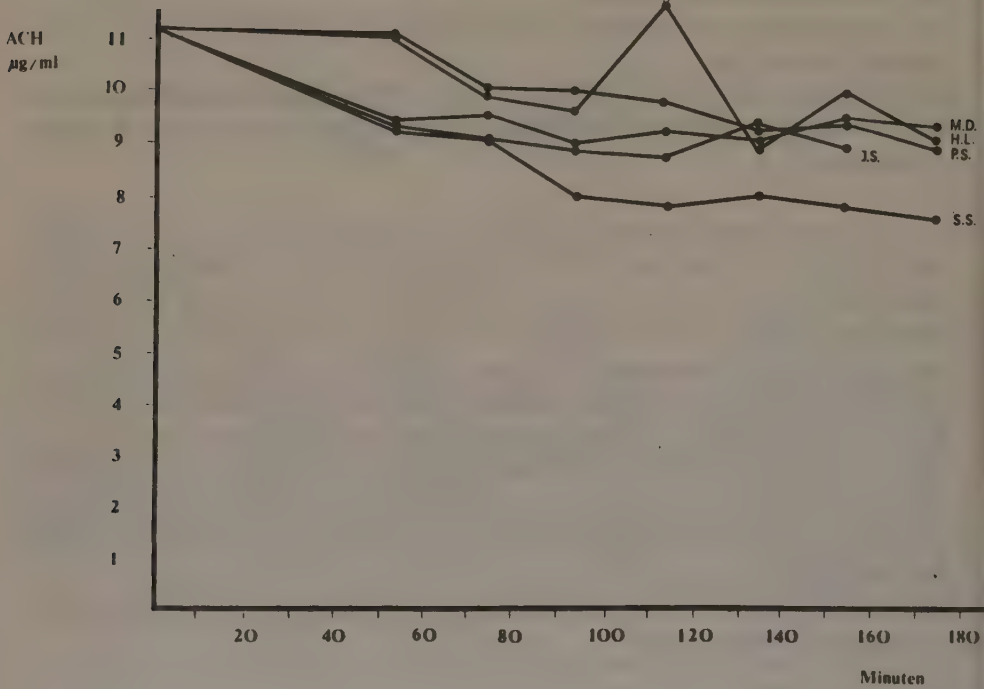
Damit unterscheiden sich die Ergebnisse nur im geringen Maße von den Ergebnissen im undialysierten Hämolysat.

In Abbildung 9 ist der ACH-Abfall in den Dialyse-Hämolysat-Proben von fünf Versuchspersonen in µg/ml dargestellt.

Abb. 9 Dialyse-Hämolysat: ACH-Verlaufskurven von 5 Vp.

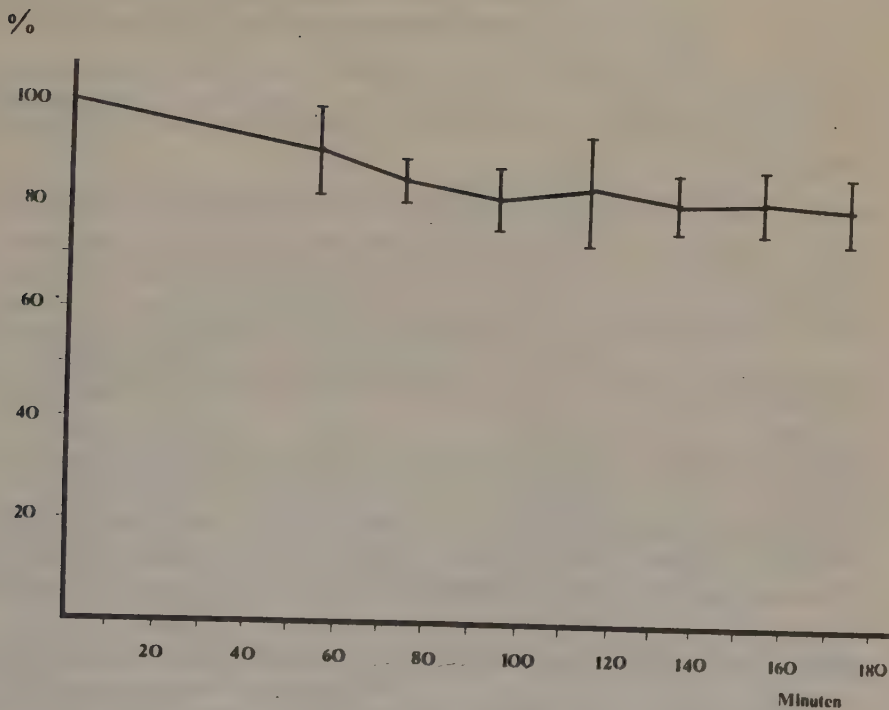
Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$

Abszisse: Zeit in Minuten



In Prozent ausgedrückt, ergab sich bei den fünf Versuchspersonen ein durchschnittlicher ACH-Abfall auf 90 % der Anfangskonzentration nach 55 Minuten. Bis zum Ende der Versuchszeit fiel die Konzentration auf 81 % ab. Die Standardabweichungen schwankten zwischen 11,31 und 4,03 %.

Abb. 10 Dialyse-Hämolysat: ACH-Verlaufskurve in % der zugesetzten Menge
Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonzentration
Abszisse: Zeit in Minuten
● Mittelwerte
I Standardabweichungen



In der Tabelle 5 sind Mittelwerte, Standardabweichungen und Range des prozentualen Abfall der Acetaldehydkonzentration dargestellt.

Die Einzelmeßwerte der ACH-Gehalte in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$, ACH $\mu\text{M/gHb}$ können den Tabellen IVa - IV e im Anhang entnommen werden.

Tab. 5 Dialyse-Hämolysat: Mittelwerte (x), Standardabweichungen (s) und Range (r) der ACH-Konzentration in % der ACH-Anfangskonzentration von fünf Versuchspersonen.

Zeit in (min.)	x	s	r
0	100	-	-
55	90,53	8,11	100 - 83,50
75	86,36	4,03	90,22 - 80,72
95	82,53	6,46	89,78 - 72,38
115	85,54	11,31	102,24 - 71,30
135	81,17	5,46	85,02 - 71,75
155	82,44	6,79	80,23 - 71,03
175	81,14	7,08	85,56 - 70,58

6. Abfall des in-vitro zugestzten Acetaldehyds im Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zusatz

Nach der Zugabe von 1mM NAD zum Dialyse-Hämolysat von vier Versuchspersonen wurde den Proben 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugemischt.

Die Hb-Gehalte und die ACH-Gehalte bezogen auf gHb entsprachen den Werten im undialysierten Hämolysat.

Nach einer Inkubationszeit von 50 Minuten bei 38° C erfolgte die erste Messung der Acetaldehydgehalte. Die weiteren Messungen wurden in Abständen von 20 Minuten durchgeführt.

In den Dialyse-Hämolysatproben nach dem NAD-Zusatz, fand sich innerhalb der ersten 50 Minuten ein rascher Abfall der ACH-Konzentrationen von 11,15 µg/ml auf 7,19 bis 6,39 µg/ml. Der weitere Kurvenverlauf zeigt ein langsames Absinken auf 5,61 bis 4,15 µg/ml nach 90 Minuten, auf 4,78 bis 3,80 µg/ml nach 130 Minuten und auch 4,52 bis 3,58 µg/ml bis zum Versuchsende (170 Minuten).

Daraus lassen sich die Abbaugeschwindigkeiten an den einzelnen Kurvenabschnitten berechnen:

Während der ersten 50 Minuten ergibt sich ein ACH-Abbau pro Minute von durchschnittlich 0,085 µg/ml. Zwischen den Meßpunkten 50 Minuten und 90 Minuten wurde ein ACH-Abbau pro Minute von 0,045 µg/ml ermittelt, zwischen den Meßpunkten 90 und 130 Minuten eine Abbaugeschwindigkeit von 0,018 µg/ml/min und vom Meßpunkt 130 Minuten bis zum Schluß eine ACH-Abbaugeschwindigkeit von 0,009 µg/ml/min.

In Abbildung 11 ist der Acetaldehydabfall im Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zugabe bei fünf Probanden in µg/ml aufgezeichnet.

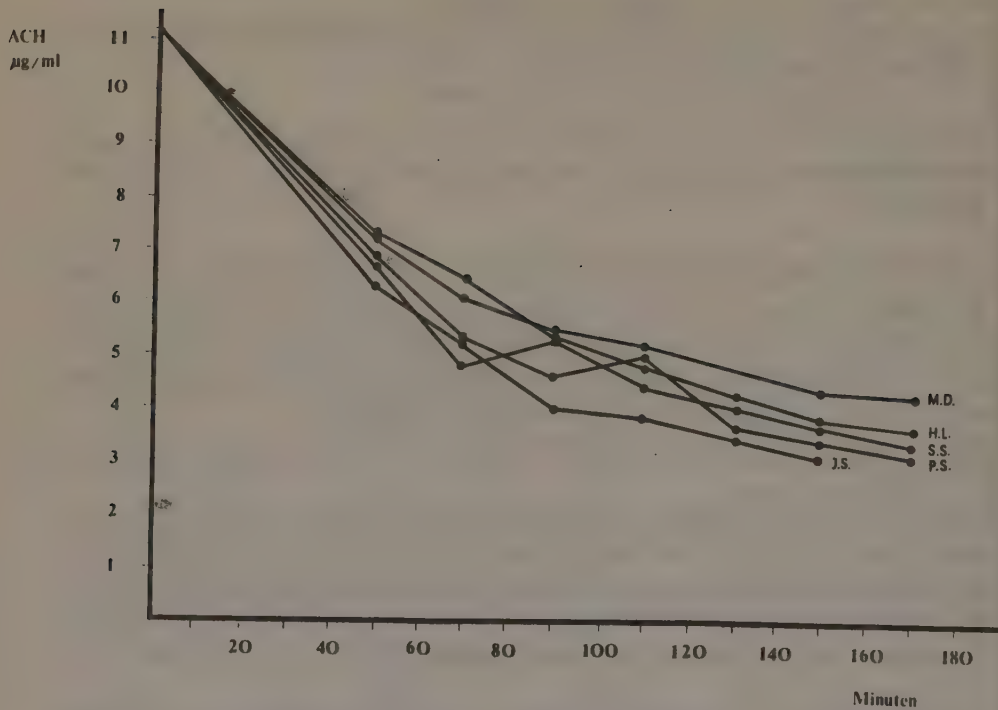
Vergleicht man diese Kurven mit denen vor der NAD-Zugabe, so sieht man eine erhebliche Steigerung des ACH-Abbaus im gleichen Zeitraum.

Abb. 11 Dialyse-Hämolysat
nach NAD-Zugabe:

ACH-Verlaufskurve von 4 Vp.

Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$

Abszisse: Zeit in Minuten



In Prozent ausgedrückt ergibt sich bei den vier Versuchspersonen im Mittel ein ACH-Abfall auf 60 % nach der 50-minütigen Inkubationszeit. Am Ende der Versuchszeit (170 min.) fiel der ACH-Gehalt bis auf 30 % der Anfangskonzentration ab, gegenüber 81 % vor der NAD-Zugabe.

Abbildung 12 zeigt den Acetaldehydabfall in % der Acetaldehydanfangskonzentration. Die Standardabweichungen schwankten zwischen 6,72 und 2,92 %.

Abb. 12 Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zugabe:

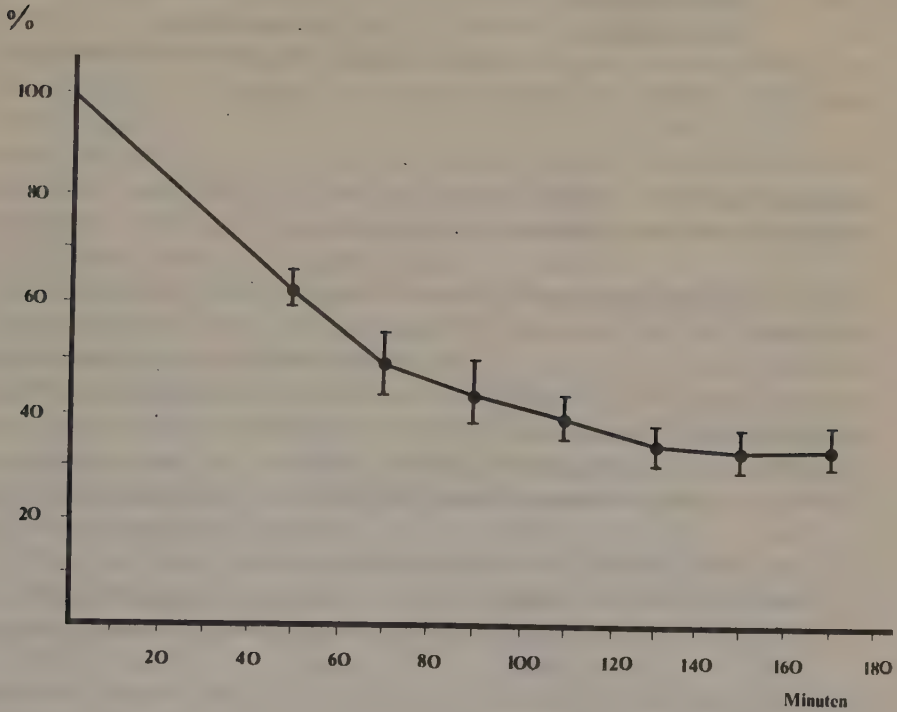
ACH-Verlaufskurven in % der zugesetzten Menge.

Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonzentration

Abszisse: Zeit in Minuten

● Mittelwerte

I Standardabweichungen



In der Tabelle 6 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Range des prozentualen Abfalls der Acetaldehydkonzentration dargestellt.

Die Einzelmeßwerte der ACH-Konzentration im Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zugabe sind den Tabellen Va - Vd im Anhang zu entnehmen.

Tab. 6 Dialyse-Hämolysat: Mittelwerte (x), Standardabweichungen (s) und Range (r) der ACH-Konzentration in % der ACH-Anfangskonzentration von vier Versuchspersonen.

Zeit in (min.)	x	s	r
0	100	-	-
50	61,94	2,92	94,48 - 57,31
70	50,48	6,72	60,00 - 44,30
90	45,86	5,92	50,31 - 37,22
110	41,95	4,58	47,89 - 36,23
130	37,54	3,78	42,87 - 34,08
150	36,48	4,28	41,26 - 32,02
170	36,70	4,20	40,54 - 32,11

7. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im Dialyse-Hämolysat nach NAD- und Disulfiramzugabe

Den Dialyse-Hämolysatproben von zwei Versuchspersonen wurde nach dem NAD- und Disulfiramzusatz, 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugemischt.

Die Hb-Werte und der ACH-Gehalt pro gHb entsprachen den Werten im undialysierten Hämolysat.

Nach der Inkubationszeit von 50 Minuten bei 38° C erfolgte die erste Messung des Acetaldehydgehaltes. Die weiteren Untersuchungen wurden in Abständen von 20 Minuten durchgeführt.

In den Proben fand sich ein Abfall der Acetaldehydgehalte von 11,15 µg/ml auf 10,20 µg/ml bzw. 10,29 µg/ml nach 50 Minuten. Dieser geringe ACH-Abbau setzte sich auch im weiteren Verlauf des Versuches fort.

Nach 90 Minuten waren noch 9,74 bzw. 9,69 µg/ml Acetaldehyd in den Proben enthalten. Nach 130 Minuten waren noch 8,44 µg/ml bzw. 9,64 µg/ml und bei Versuchsende noch 10,02 µg/ml bzw. 9,78 µg/ml enthalten.

Das ergibt eine ACH-Abbaurrate pro Minute von 0,018 µg/ml in den ersten 50 Minuten. Zwischen den Meßpunkten 50 Minuten und 90 Minuten errechnet sich eine ACH-Abbaugeschwindigkeit von 0,012 µg/ml/min, zwischen den Meßpunkten 90 und 130 Minuten eine Abbaugeschwindigkeit von 0,033 µg/ml/min und zwischen den Meßpunkten 130 Minuten und 170 Minuten kein ACH-Abbau.

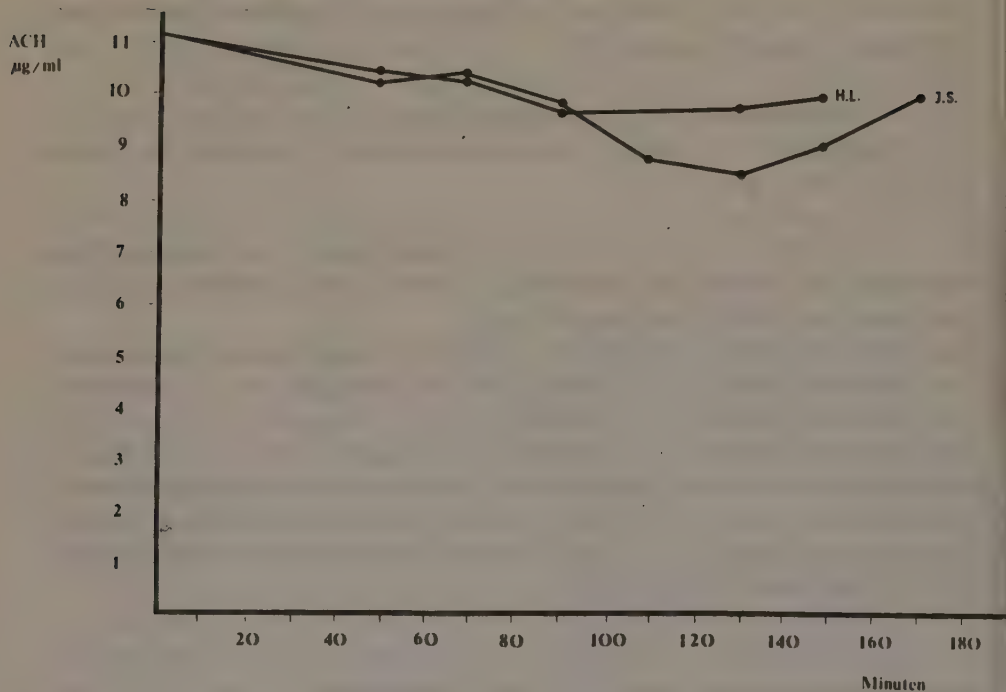
In Abbildung 13 ist der ACH-Abfall in den Dialyse-Hämolysat-Proben nach NAD- und Disulfiramzusatz von zwei Probanden in µg/ml dargestellt.

Abb. 13 Dialyse-Hämolysat nach NAD- und Disulfiramzugabe:

ACH-Verlaufskurve von 2 Vp.

Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$

Abszisse: Zeit in Minuten



In Prozent ausgedrückt ergibt sich ein ACH-Konzentrationsabfall auf 92 % der Anfangskonzentration innerhalb der Inkubationszeit von 50 Minuten und auf 84 % innerhalb der Versuchszeit von 150 Minuten.

Vor der Disulfiramzugabe war ein Abfall der ACH-Gehalte auf 36 % im gleichen Zeitraum zu verzeichnen.

Dies weist auf die Hemmwirkung des Disulfirams auf den Acetaldehydabbau hin. Abbildung 14 zeigt den Acetaldehydabfall in % der Acetaldehydanfangskonzentration.

Abb. 14 Dialyse-Hämolysat nach NAD- und Disulfiramzugabe:

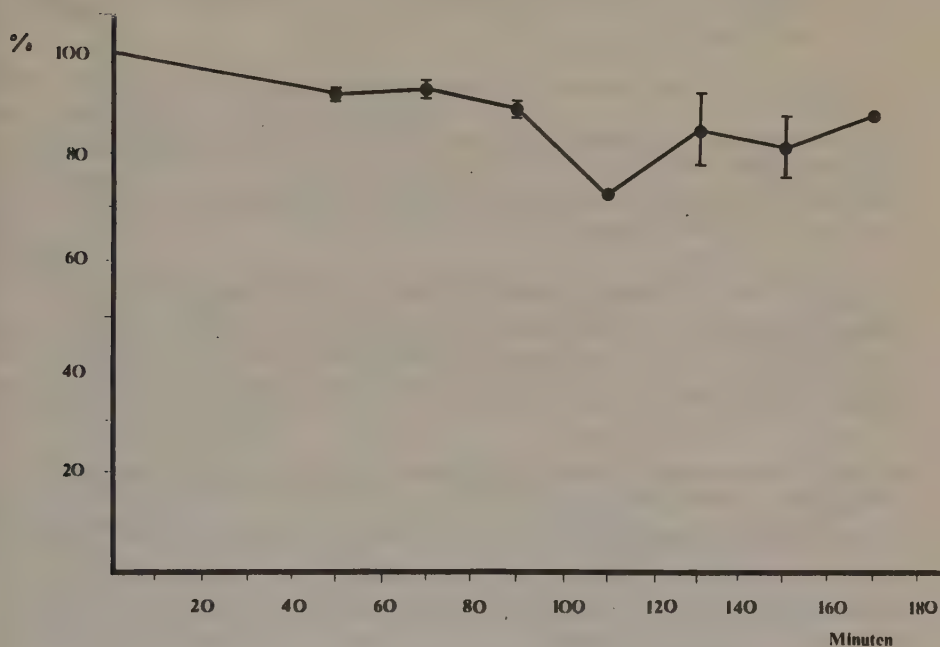
ACH-Verlaufskurven in % der zugesetzten Menge.

Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonzentration

Abszisse: Zeit in Minuten

● Mittelwerte

I Standardabweichungen



In der Tabelle 7 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des prozentualen Abfalles der Acetaldehydkonzentration dargestellt.

Die Einzelmeßwerte der ACH-Konzentration in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH g/gHb , und ACH $\mu\text{M/gHb}$ können den Tabellen VIa - VId im Anhang entnommen werden.

Tab. 7 Dialyse-Hämolysat nach NAD- und Disulfiramzugabe:

Mittelwerte (x), Standardabweichungen (s) und Range (r) der Meßwerte in % von 2 Vp.

Zeit in (min.)	x	s	r
0	100	-	-
50	91,89	0,54	92,29 - 91,48
70	92,17	1,57	93,27 - 91,03
90	87,11	0,35	86,91 - 83,14
110	74,17	-	-
130	87,12	7,59	86,46 - 75,70
150	83,78	5,55	87,71 - 79,82
170	89,09	-	-

8. Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds im menschlichen Plasma

Den Plasmaproben von sechs Versuchspersonen wurden 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugemischt.

Nach der Inkubationszeit von 40 Minuten im 38° C warmen Wasserbad erfolgte die erste Messung. Die weiteren Untersuchungen fanden in Abständen von jeweils 20 Minuten statt.

In den Plasmaproben fand sich nach 40 Minuten ein Absinken des Acetaldehydgehaltes von 11,15 µg/ml auf 10,54 bis 7,54 µg/ml.

Im weiteren Kurvenverlauf ergab sich ein Abfall der ACH-Konzentration auf 9,57 bis 6,69 µg/ml nach 80 Minuten, nach 120 Minuten fand sich ein Absinken auf 8,67 bis 6,02 µg/ml und bei Versuchsende ein Abfall der ACH-Gehalte auf 8,53 bis 5,46 µg/ml.

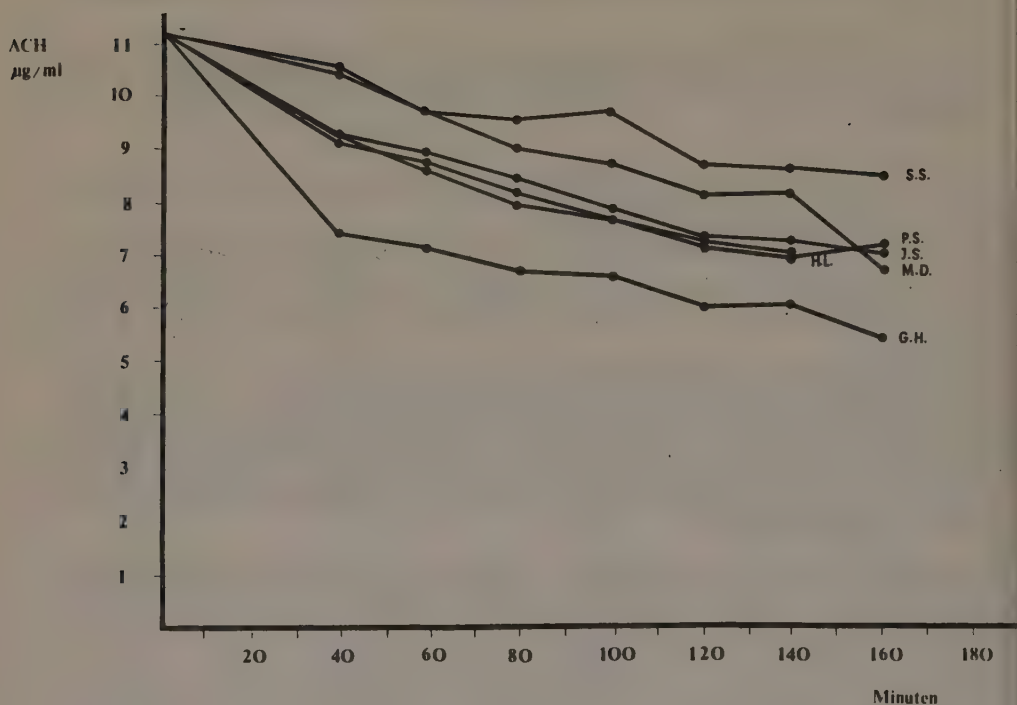
Das entspricht einer durchschnittlichen ACH-Abbaugeschwindigkeit von 0,045 µg/ml/min während der ersten 40 Minuten, von 0,024 µg/ml/min zwischen den Meßpunkten 40 Minuten und 80 Minuten, 0,020 µg/ml/min zwischen den Meßpunkten 80 und 120 Minuten und einer ACH-Abbaugeschwindigkeit von 0,015 µg/ml/min vom Meßpunkt 120 Minuten bis zum Versuchsende.

Die Abbildung 15 zeigt den ACH-Abfall in µg/ml in den Plasmaproben von sechs Versuchspersonen.

Abb. 15 Plasma: ACH-Verlaufskurve von 6 Vp.

Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$

Abszisse: Zeit in Minuten

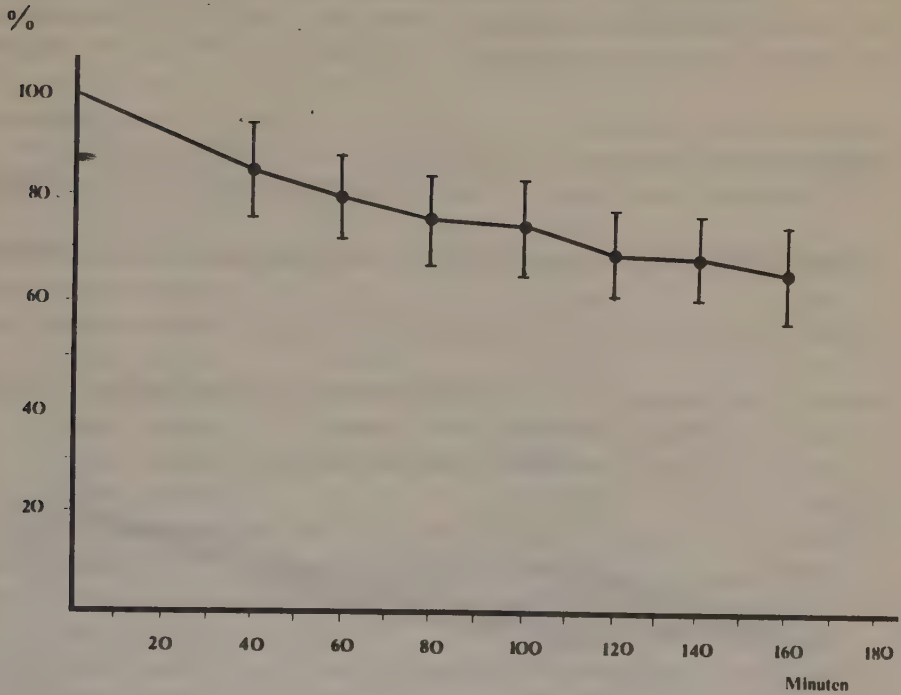


In Prozent der ACH-Anfangskonzentrations ausgedrückt ergibt sich ein ACH-Abfall von 15 % innerhalb 40 Minuten.

Am Ende der Versuchszeit ist der ACH-Gehalt auf 36 % abgesunken.

Die Standardabweichungen schwankten zwischen 9,80 und 8,51 %.

Abb. 16 Plasma: ACH-Verlaufskurven in % der zugesetzten Menge.
Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonz.
Abszisse: Zeit in Minuten
● Mittelwerte
I Standardabweichungen



In der Tabelle 8 sind die Mittelwerte $\bar{x}$, Standardabweichungen s und Range r des prozentualen Abfalles der Acetaldehydkonzentration dargestellt.

Die Einzelmeßwerte in ACH $\mu\text{g/ml}$ sind in Tabelle VIIa - VIIf im Anhang aufgeführt.

Tab. 8 Plasma:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s) und Range (r) der Meßwerte in % von 6 Versuchspersonen:

Zeit in (min.)	$\bar{x}$	s	r
0	100	-	-
40	84,53	9,72	94,53 - 67,62
60	80,43	8,91	88,34 - 64,30
80	76,60	8,99	85,83 - 60,00
100	74,60	9,25	86,46 - 59,01
120	69,75	8,51	77,76 - 53,99
140	68,73	8,60	77,66 - 54,62
160	64,00	9,80	76,50 - 48,97

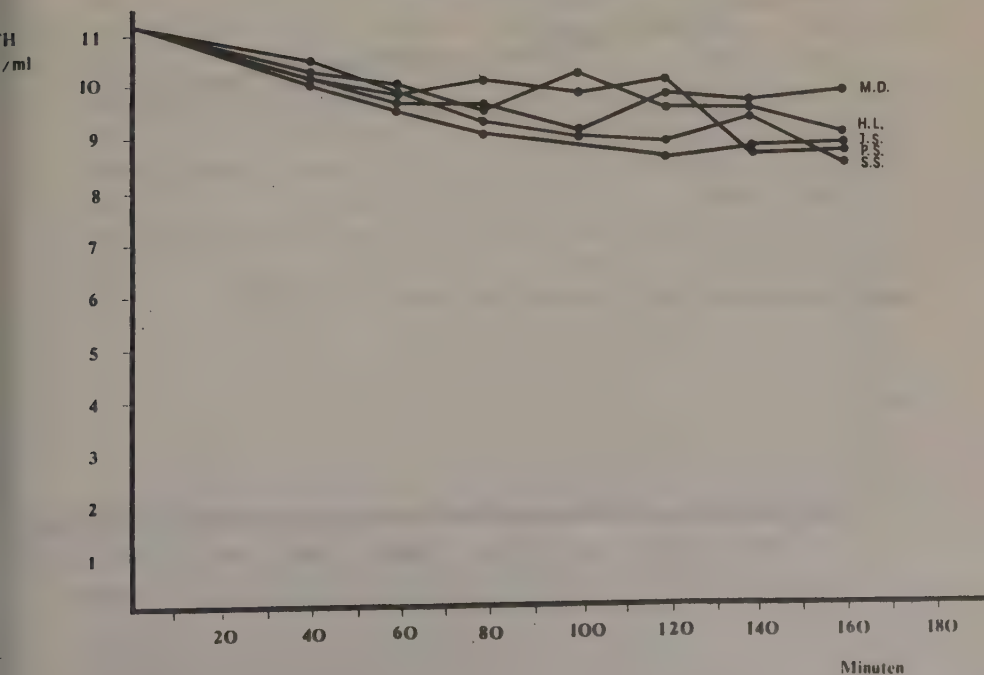
Im dialysierten Plasma fanden wir unter den sonst gleichen Bedingungen einen Abfall des ACH-Gehaltes von 11,15 $\mu\text{g/ml}$ auf 10,44 - 10,23 $\mu\text{g/ml}$ nach 40 Minuten. Nach 80 Minuten war der ACH-Gehalt auf 10,00 - 9,35 $\mu\text{g/ml}$, nach 120 Minuten auf 9,95 - 8,95 $\mu\text{g/ml}$ und bei Versuchsende auf 9,72 - 8,55 $\mu\text{g/ml}$ abgesunken.

Das entspricht einem Abfall der ACH-Konzentration pro Minute von 0,021 $\mu\text{g/ml}$ während der ersten 40 Minuten, einem Abfall pro Minute von 0,012 $\mu\text{g/ml}$ zwischen den Meßpunkten 40 - 80 min., einem Abfall pro Minute von 0,001 $\mu\text{g/ml}$ zwischen den Meßpunkten 80 und 120 Minuten und bis Versuchsende einem Abfall pro Minute der ACH-Konzentration von 0,015 $\mu\text{g/ml}$.

Im Vergleich zum nativen Plasma ist der Abfall des Acetaldehydgehaltes im Dialyseplasma demnach etwas geringer.

Abbildung 17 zeigt den ACH-Abfall im Dialyseplasma von fünf Versuchspersonen in $\mu\text{g/ml}$.

Abb. 17 Dialyse-Plasma: ACH-Verlaufskurve von 5 Vp.
Ordinate: ACH-Konzentration in $\mu\text{g/ml}$
Abszisse: Zeit in Minuten

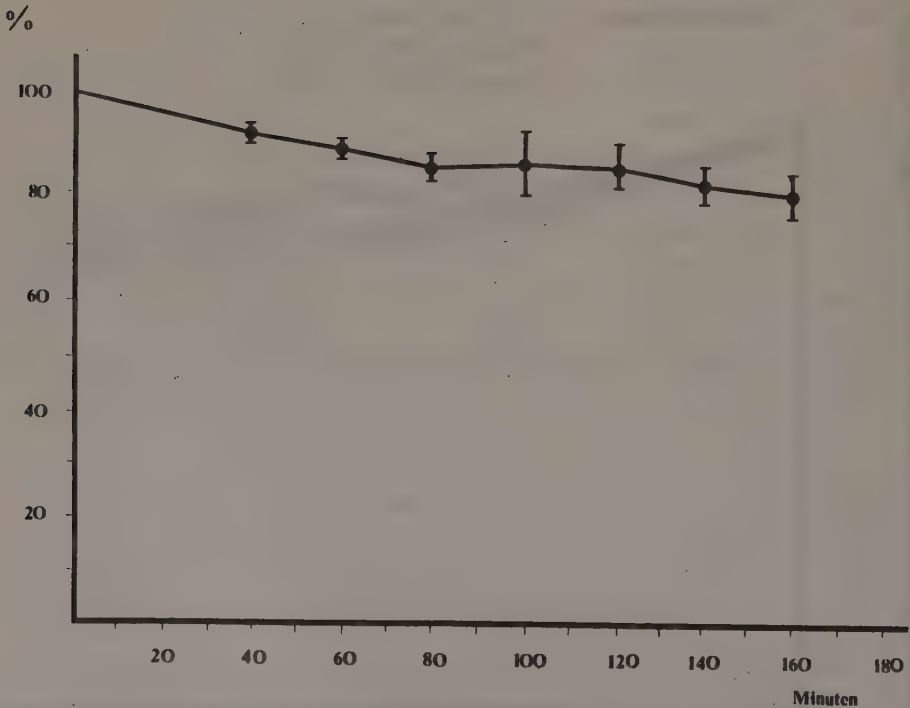


In Prozent der ACH-Anfangskonzentration ausgedrückt ergab sich im Dialyse-Plasma ein mittlerer Abfall auf 93 % während der Inkubationszeit, und auf 81 % bis zum Versuchsende.

Die Standardabweichungen schwankten zwischen 5,71 und 0,77 %.

Abbildung 18 zeigt den Acetaldehydabfall in Prozent der ACH-Anfangskonzentration. Der Zusatz von NAD und Disulfiram zum Dialyse-Plasma ergab keine Konzentrationsverlaufsänderung.

Abb. 18 Dialyse-Plasma: ACH-Verlaufskurven in % der zugesetzten Menge.
Ordinate: Mittl. ACH-Konzentration in % der Anfangskonz.
Abszisse: Zeit in Minuten
● Mittelwerte
I Standardabweichungen



In der Tabelle 9 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Range des prozentualen Abfalles der Acetaldehydkonzentration dargestellt.

Die Einzelmeßwerte der ACH-Konzentrationen im Dialyse-Plasma von fünf Versuchspersonen sind in den Tabellen VIIla - VIIle im Anhang aufgeführt.

Tab. 9 Dialyse-Plasma:

Mittelwerte (x), Standardabweichungen (s) und Range (r) der Meßwerte in % der ACH-Anfangskonzentration von 5 Versuchspersonen:

Zeit in (min.)	x	s	r
0	100	-	-
40	92,58	0,77	93,63 - 91,75
60	89,10	1,35	90,85 - 87,62
80	85,76	2,40	89,69 - 83,86
100	85,42	5,71	92,56 - 80,99
120	84,35	4,50	89,60 - 80,27
140	82,73	2,63	85,38 - 79,73
160	80,78	4,15	87,17 - 76,68

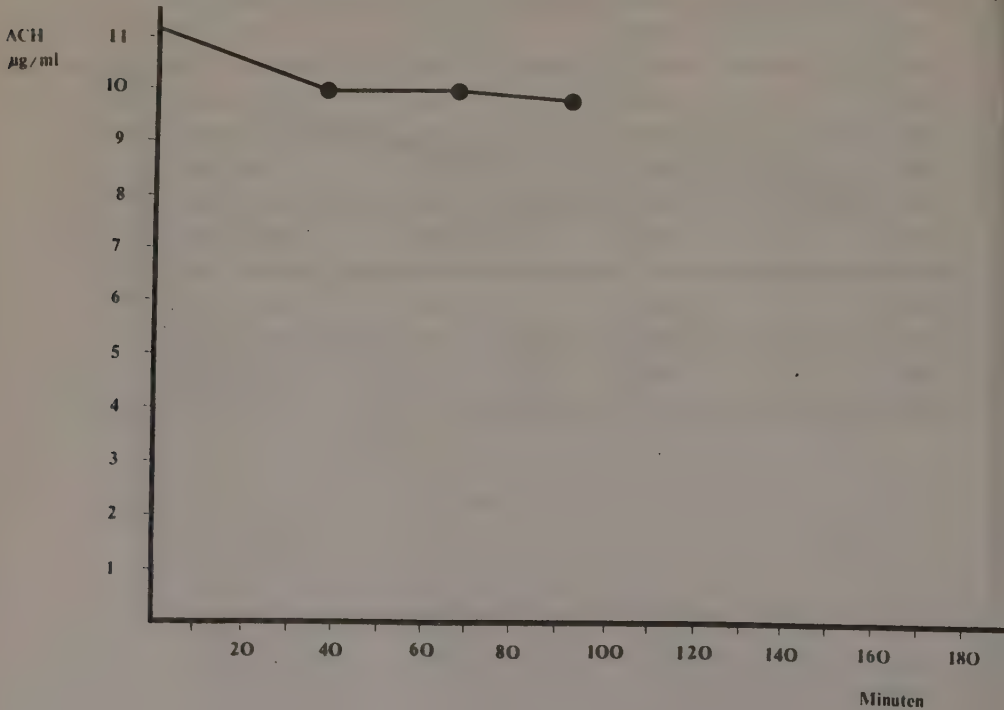
Um den Anteil des Acetaldehyds abschätzen zu können, der im Plasma an Albumin gebunden wird, untersuchten wir den Abfall des Acetaldehydgehaltes in einer 5 %-igen Humanalbuminlösung.

Drei Albuminproben wurden jeweils 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugesetzt. Nach der Inkubationszeit von 40 Minuten bei 38° C wurde der Acetaldehydgehalt das erste Mal gemessen. Weitere Messungen erfolgten in Abständen von 30 und 25 Minuten. In den Humanalbuminproben fand sich ein Abfall der ACH-Gehalte von 9,83 bis 9,95 µg/ml.

Das entspricht einem prozentualen Abfall der ACH-Konzentration von 10 - 12 %. Bei Versuchen mit einer 0,5 %-igen Albuminlösung war kein nennenswerter ACH-Abfall zu verzeichnen.

Abbildung 19 zeigt den ACH-Abfall in den Humanalbumin-Proben in µg/ml.

Abb. 19: Humanalbumin: ACH-Abfall in µg/ml.



In der Tabelle 10 sind die Meßwerte der ACH-Konzentrationen in einer 5 %-igen Humanalbuminlösung in $\mu\text{g/ml}$ und % der ACH-Anfangskonzentration aufgeführt.

Tab. 10: Meßwerte der ACH-Konzentration in 5 %-iger Humanalbuminlösung, in ACH $\mu\text{g/ml}$ und in % der ACH-Anfangskonzentration:

Zeit in (min)	ACH- $\mu\text{g/ml}$	% der ACH-Anfangskonz.
0	11,15	100
40	9,95	89,26
70	9,94	89,18
95	9,83	88,17

9. Übersichten über den ACH-Abfall und die ACH-Abbaugeschwindigkeit in den unterschiedlich aufbereiteten Blutbestandteilen

Die Diagramme 20 und 21 zeigen die ACH-Abbaukurven in den einzelnen Untersuchungsproben auf einen Blick.

Die Kurven des Vollblutes und des Plasmas sind in einem eigenen Diagramm aufgetragen, da sie wegen der unterschiedlichen Hb-Gehalte nicht direkt mit den Ergebnissen in den Erythrozyten- und Hämolysatproben vergleichbar sind.

Abb. 20 Übersicht: ACH-Abbaukurve in % der zugesetzten Menge.
 Ordinate: ACH-Abfall in den Erythrozyten-, Hämolysat-, Dialyse-Hämolysatproben, Dialyse-Hämolysatproben nach NAD-Zusatz und Dialyse-Hämolysatproben nach NAD- und Disulfiramzusatz.
 Abszisse: Zeit in Minuten
 B = Erythrozyten E = Dialyse-Hämolysat nach nach NAD Zugabe
 C = Hämolysat
 D = Dialyse-Hämolysat F = Dialysehämolysat nach NAD- und Disulfiramzugabe

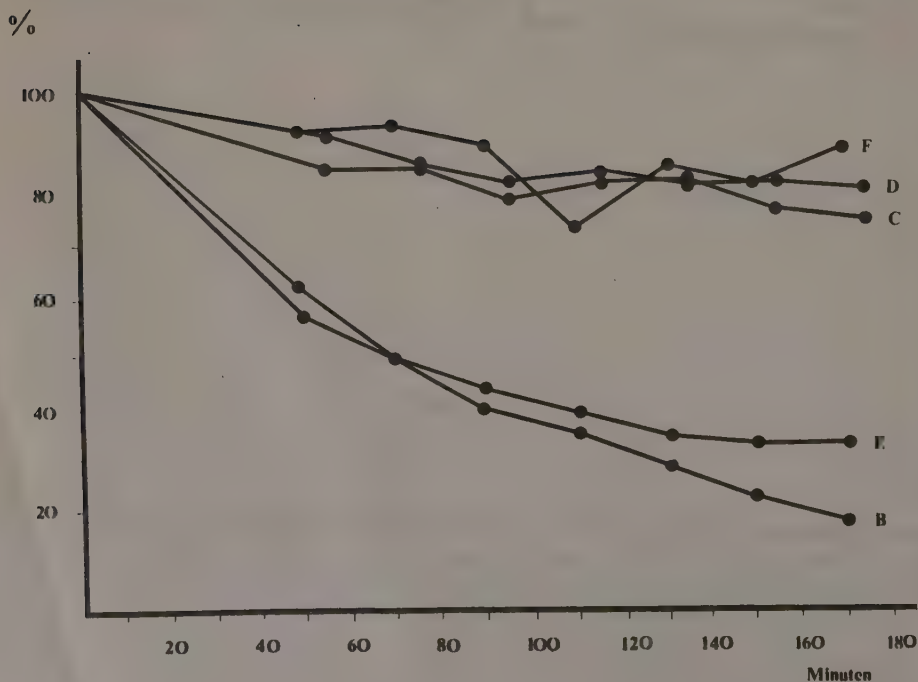


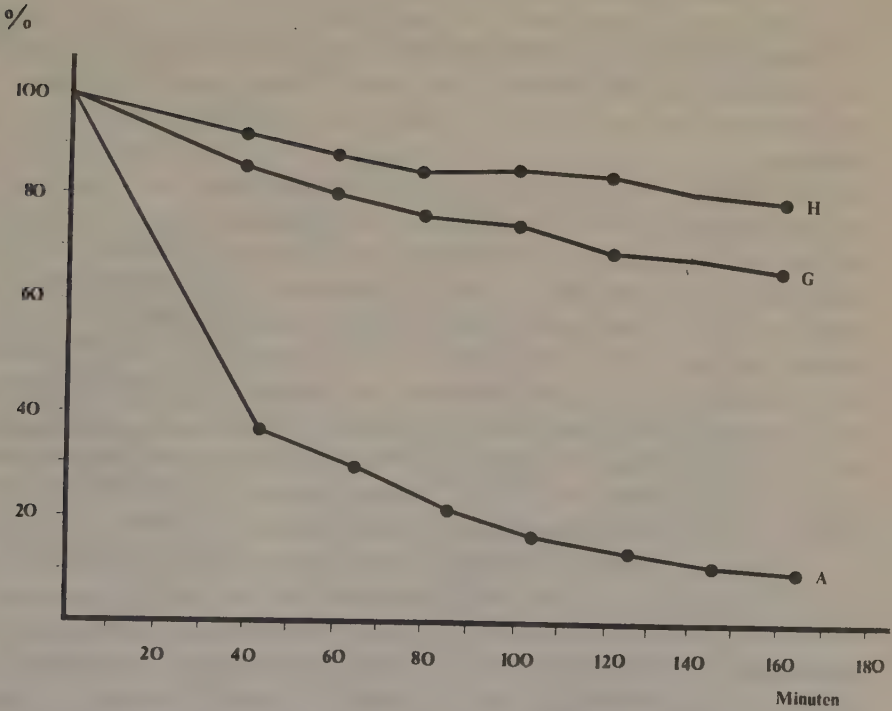
Abb. 21 Übersicht:

ACH-Abnahme in % der zugesetzten Menge.

Ordinate: ACH-Abfall in den Vollblutproben, Plasmaproben und Dialyse-Hämolysatproben.

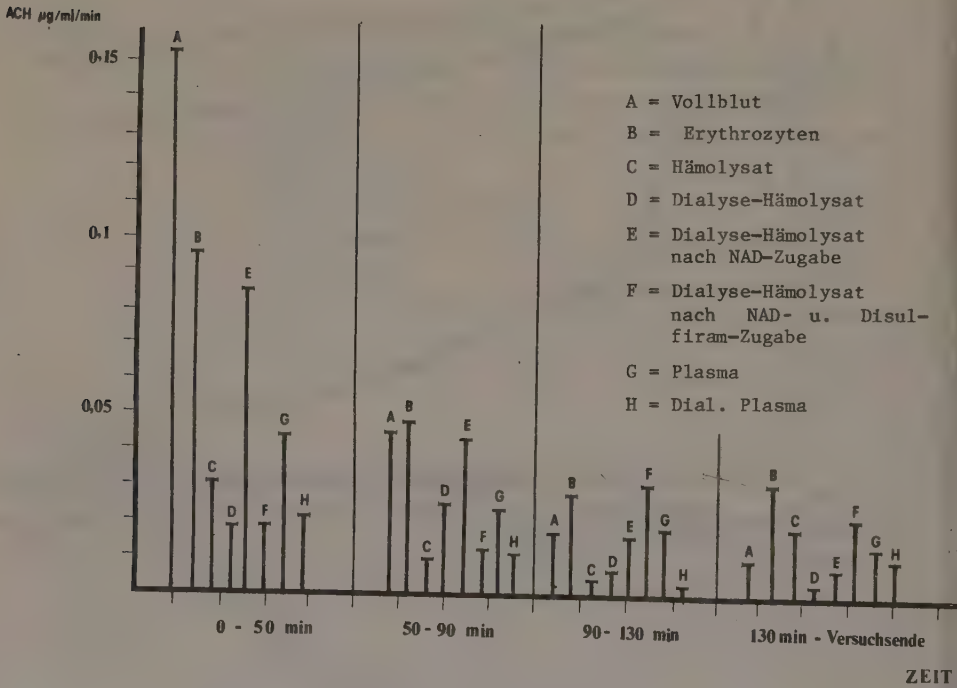
Abszisse: Zeit in Minuten

A = Vollblut; G = Plasma; H = Dialyseplasma



In der unten stehenden Abbildung ist eine Übersicht über die durchschnittlichen Abbaugeschwindigkeiten in den verschiedenen Blutbestandteilen zu sehen. Die jeweiligen Versuchszeiten wurden hierzu in vier Abschnitte unterteilt, für die jeweils die mittleren ACH-Abbaugeschwindigkeiten ermittelt wurden.

Abb. 22 Mittlere ACH-Abbaugeschwindigkeit in den verschiedenen Blutbestandteilen in $\mu\text{g/ml/min.}$:



IV. Diskussion

Acetaldehyd ist das wichtigste Abbauprodukt im Äthanolmetabolismus beim Menschen. Das Enzym Acetaldehyddehydrogenase katalysiert den Abbau des Acetaldehyds hauptsächlich in der Leber, aber auch in anderen Organen des menschlichen Körpers. So ist ein rascher Abfall der ACH-Konzentration auch im menschlichen Blut festzustellen. WARTBURG (1980)⁽³²⁾ beschreibt einen schnellen Abfall des in-vitro zugesetzten Acetaldehyds (100 μM) im Vollblut auf 50 % der Anfangsmenge innerhalb fünf Minuten. SCHÖNIGER (1983)⁽²⁵⁾ fand nach Zugabe von 2000 μM Acetaldehyd zum Vollblut, daß nach fünf Stunden durchschnittlich 86,2 % der ACH-Menge nicht mehr nachzuweisen waren.

Im Abbau des ACH im menschlichen Körper scheint es allerdings genetisch bedingte Unterschiede zu geben. Man führt dies auf unterschiedliche ALDH-Isoenzymmuster zurück. So stellte z.B. HARADA et al. (1980)⁽¹⁷⁾ einen Zusammenhang zwischen der ermittelten Frequenz eines Isoenzym der ALDH und der beobachteten Häufigkeit des bei hohen ACH-Konzentrationen auftretenden Flush-Syndroms in der mongoloiden Bevölkerung fest. Andere Autoren (20, 26) fanden Unterschiede in den ACH-Konzentrationen im Blut von Alkoholikern und Nicht-Alkoholikern bei gleichen Blutalkoholspiegeln. Es stellte sich allerdings heraus, daß sich in Anwesenheit von Äthanol auch auf nicht-enzymatischem Wege ACH bilden kann, wenn zur Enteiweißung der Proben Perchlorsäure verwendet wurde (8, 30, 32). So könnte ein Teil der oben erwähnten Unterschiede in den gemessenen Blut-ACH-Konzentrationen auch auf unterschiedliche Mengen dieser ACH-Neubildung zurückzuführen sein⁽³²⁾.

Zur Vermeidung solcher Fehlerquellen wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis des Acetaldehyds eine Methode angewandt, mit deren Hilfe wir die ACH-Gehalte in den Proben fortlaufend messen konnten, ohne diese vorher mit Perchlorsäure enteiweißen zu müssen. Ein weiterer Vorteil unserer Methode ist, daß die Equilibrierungstemperaturen niedrig gehalten werden konnten (38° C) und somit Proteindenaturierung und Zerstörung von Enzymen verhindert wurden.

Im Gegensatz zu INOUE et al. (18) und WARTBURG (32) und SCHÖNIGER (25) die mit hohen ACH-Konzentrationen arbeiteten ($> 100 \mu\text{M}$), untersuchten wir in dieser Arbeit den Abfall des Acetaldehydgehaltes im Blut bei niedrigen Anfangskonzentrationen (0,25 μM).

Bei dieser niedrigen Anfangskonzentration war es besonders wichtig, daß keine auch noch so kleine Mengen artifiziell gebildeten Acetaldehyds, durch ungeeignete Analysenverfahren, dazukamen.

Neben dem ACH-Abfall im Vollblut von sechs Versuchspersonen, wurden auch die ACH-Abfälle im Plasma, in Erythrozytensuspensionen und im Hämolysat untersucht.

Die mit unserer Methode gewonnenen Analysenergebnisse zeigten erhebliche Unterschiede in den ACH-Abbaugeschwindigkeiten in den oben genannten Versuchsproben: Die höchsten ACH-Abbaugeschwindigkeiten konnten im Vollblut festgestellt werden. Sie betrug am Anfang der Analysenzeit durchschnittlich $0,154 \mu\text{g/ml/min}$. Am Ende der Beobachtungszeit betrug die Abbaugeschwindigkeit im Vollblut durchschnittlich noch $0,010 \mu\text{g/ml/min}$. In den Erythrozytensuspensionen ermittelten wir eine Anfangsabbau-geschwindigkeit von durchschnittlich $0,095 \mu\text{g/ml/min}$. und am Ende eine Abbaugeschwindigkeit von durchschnittlich $0,033 \mu\text{g/ml/min}$. In den Hämolysatproben waren die entsprechenden ACH-Abbaugeschwindigkeiten $0,030 \mu\text{g/ml/min}$ am Anfang und $0,018 \mu\text{g/ml/min}$ am Ende der Versuchszeit.

Im Dialysehämolysat betrug die Anfangsgeschwindigkeit $0,019 \mu\text{g/ml/min}$, und die Abbaugeschwindigkeit am Ende der Versuchszeit $0,002 \mu\text{g/ml/min}$.

Nach Zugabe von 1 mM NAD zum Dialysehämolysat war die Abbaugeschwindigkeit wieder höher. Sie betrug am Anfang der Beobachtungszeit $0,085 \mu\text{g/ml/min}$ und am Ende $0,009 \mu\text{g/ml/min}$.

Die Disulfiramzugabe bewirkte eine Verringerung der Abbaugeschwindigkeit, aber keine vollständige Blockierung des Acetaldehydabbaus. In den Dialyse-Hämolysatproben nach NAD- und Disulfiramzugabe registrierten wir einen ACH-Abbau pro Minute von $0,018 \mu\text{g/ml}$ während der ersten 50 Minuten und am Ende der Versuchszeit einen Abbau pro Minute von $0,024 \mu\text{g/ml}$.

In den Plasmaproben war vor der Dialyse eine Anfangsgeschwindigkeit von durchschnittlich $0,045 \mu\text{g/ml/min}$ und nach der Dialyse eine Anfangsgeschwindigkeit von $0,021 \mu\text{g/ml/min}$ zu verzeichnen. Am Ende der Versuchszeit lagen die Abbaugeschwindigkeiten bei durchschnittlich $0,015 \mu\text{g/ml/min}$ vor der Dialyse und bei ebenfalls $0,015 \mu\text{g/ml/min}$ nach der Dialyse.

Man sieht, daß die Unterschiede in den Abbaugeschwindigkeiten zu Beginn der Versuchszeiten am größten sind. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes gleichen sich die Geschwindigkeiten immer mehr an.

Der rasche Abfall der ACH-Konzentrationen im Vollblut ist auf das komplexe Zusammenwirken der Aktivität der ALDH in den Erythrozyten (ALDH II)⁽¹⁶⁾, von Proteinbindungen und Bindungen an Erythrozytenmembranen zurückzuführen.

Die ACH-Konzentrationen waren infolge der hohen Abbaugeschwindigkeit in den Vollblutproben schon während der Inkubationszeit von 45 Minuten, in der keine Messung vorgenommen wurde, auf durchschnittlich 38 % und nach weiteren zwei Stunden auf durchschnittlich 12 % der ACH-Anfangskonzentration abgefallen. Dieser rasche Abfall entspricht den Ergebnissen von WARTBURG⁽³²⁾, INOUE⁽¹⁸⁾ und SCHÖNIGER⁽²⁵⁾, die allerdings höhere Anfangskonzentrationen einsetzten.

Auffallend ist der Verlauf der ACH-Abbaukurve im Vollblut. Sie nähert sich asymptotisch einem Gleichgewichtswert. Möglicherweise spielt bei den verwendeten niedrigen ACH-Konzentrationen die Rückreaktion Essigsäure zu Acetaldehyd eine Rolle. Bei einer Anfangskonzentration von 11,15 µg/ml Acetaldehyd im Vollblut, lag dieser Gleichgewichtswert bei durchschnittlich 1,2 µg/ml.

In den Erythrozytenproben fiel die ACH-Konzentration innerhalb von 175 Minuten von 100 % auf durchschnittlich 18 % ab. Der starke ACH-Abfall in den Erythrozytensuspensionen zeigt, daß die roten Blutkörperchen für den größten Anteil des ACH-Schwundes im Blut verantwortlich sind.

Die im Gefäßsystem zirkulierenden Erythrozyten dürften damit ein nicht zu vernachlässigendes Kompartiment, neben Leber und anderen inneren Organen, im Acetaldehydmetabolismus sein.

Die Unterschiede im ACH-Schwund in den Erythrozytensuspensionen zum ACH-Schwund im Vollblut ergeben sich aus den höheren Hb-Werten in den Vollblutproben (zwischen 12 und 16 gHb/100ml) im Vergleich zu den Hb-Werten in den verwendeten Erythrozytensuspensionen (um 6 gHb/100ml). Den Erythrozytenproben fehlte außerdem der Plasmaanteil des Vollblutes, der auch einen Teil des Acetaldehyds bindet.

Die Kurvenläufe der Erythrozytenproben, die aus Zitratblut hergestellt wurden fielen deutlich aus der Kurvenschar, der aus Frischblut gewonnenen Proben heraus. Man kann daraus folgern, daß Zitratblut aus der Blutbank für derartige in-vitro-Versuche mit Acetaldehyd nicht geeignet ist. Wahrscheinlich kommen hier Alterungsvorgänge im Zitratblut, z.B. Erythrozytenmembranveränderungen und Aktivitätsminderungen der Enzyme zum Tragen.

Im Plasma betrug der ACH-Schwund durchschnittlich 35 % nach 160 Minuten, wobei aber die interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Probandenplasmen relativ groß waren. Die Standardabweichungen schwankten bei den Versuchen mit nativem Plasma zwischen 8,6 und 9,8 % der ACH-Anfangskonzentration und waren damit höher als bei den Versuchen mit Erythrozyten, Hämolysat und Dialyseplasma. Bei unserer ersten Messung nach der 40-minütigen Inkubationszeit fanden wir einen ACH-Schwund von 15 %.

WARTBURG (32) registrierte mit seiner gaschromatographischen Methode nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37° C einen ACH-Schwund von 4,6 % $\pm$ 2,7 % bei einer Anfangskonzentration von 100 μ M.

SCHÖNIGER (25) fand bei ACH-Konzentrationen im mM-Bereich einen raschen ACH-Abfall von bisher 19,7 % während der Inkubationszeit von 40 Minuten.

Offensichtlich handelt es sich beim ACH-Schwund im Plasma um reine Bindungsreaktionen an Plasmaeiweiße und niedermolekulare Stoffe.

Die interindividuellen Unterschiede beim ACH-Schwund im Plasma der einzelnen Probanden sind verständlich, wenn man bedenkt, daß bei der Blutabnahme der Gehalt an Plasmaeiweiß und anderen Stoffen im Plasma der einzelnen Versuchspersonen sicherlich verschieden war.

Den Anteil der niedermolekularen Stoffe konnten wir in unseren Versuchen durch die Dialyse des Plasmas verringern. Der ACH-Schwund verminderte sich damit um bis zu 15 % in unseren Versuchen.

Um einen Schätzwert für die Eiweißbindung des Acetaldehyds mit 5 %-iger Albuminlösung durch, da Albumin die größte Eiweißfraktion im Plasma bildet.

Nach unseren Ergebnissen betrug der Anteil des an Albumin gebundenen Acetaldehyds, maximal 12 %.

Da in den Erythrozytensuspensionen noch die Bindung von ACH an die Erythrozytenmembranen den rein enzymatisch bedingten ACH-Schwund überlagert, führten wir Versuche mit ultrazentrifugiertem stromafreien Hämolysat durch. Im nativen Hämolysat war, trotz gleichen Hb-Gehalts wie in den Erythrozytenproben, nur ein geringer Acetaldehydschwund zu verzeichnen. Er betrug nach 175 Minuten durchschnittlich nur 26 % und war damit kaum größer als der ACH-Schwund im Dialyse-Hämolysat, der sich auf durchschnittlich 20 % im gleichen Zeitraum belief.

Offensichtlich war durch den Hämolysierungsvorgang NAD verloren gegangen und daher der angestrebte weitere NAD-Verlust durch die Dialyse und damit die Verminderung der ALDH-Aktivität nur gering.

Nach Zugabe einer 5mM NAD-Lösung war dagegen die ACH-Abbaurrate im Dialysehämolysat stark erhöht. Auch INOUE (18) beschreibt eine starke Abhängigkeit der ALDH-Aktivität von NAD.

In unseren Versuchen fiel die ACH-Konzentration innerhalb 175 Minuten um durchschnittlich 65 % ab.

Die starke Hemmwirkung von Disulfiram auf die Erythrozyten ALDH, die INOUE (18) und HARADA et al. (16) beschreiben, konnte ebenfalls bei unseren Versuchen bestätigt werden. In unseren Versuchen bewirkte die Zugabe einer 5 μ M Disulfiram-Lösung zum Hämolytat, daß die ACH-Konzentration nach 175 min. nur um durchschnittlich 20 % abgefallen war. Das entsprach ungefähr den Werten im dialysierten Hämolytat vor der NAD-Zugabe.

NAD- und Disulfiramzusatz zum Plasma ergaben dagegen keinerlei Effekte. Ein Acetaldehyd abbauendes Enzym dürfte daher im Plasma nicht vorliegen.

Km-Werte der Erythrozyten-ALDH konnten wir in dieser Arbeit nicht bestimmen. Um im Substratsättigungsbereich des Enzyms zu liegen und damit die Anfangsgeschwindigkeit $v_{\max}$ des Substratumsatzes ermitteln zu können, wären wesentlich höhere ACH-Konzentrationen, als wir sie verwendeten, nötig gewesen.

Ziel unserer Arbeit war es dann aber, unsere Methode zur ACH-Bestimmung bei niedrigen ACH-Anfangskonzentrationen, wie sie auch physiologischerweise vorkommen, zu überprüfen.

Am Schluß sollen die Ergebnisse, die sich aus unseren Versuchen ergaben, für zukünftige in-vitro-Acetaldehydversuche zusammengefaßt werden:

1. Mit Hilfe unserer gaschromatographischen Methode kann der ACH-Gehalt im Blut ohne die Enteiweißung durch Perchlorsäure und damit ohne die damit verbundenen Fehlerquellen bestimmt werden.
2. Um den Einfluß der Erythrozyten-ALDH auf den Acetaldehydgehalt im Blut nach der Blutentnahme möglichst schnell zu unterbinden, sollte sofort das Blutplasma von den Erythrozyten mittels einer Kühlzentrifuge abgetrennt werden.
Das Plasma sollte sofort stark abgekühlt und gut verschlossen ins Labor transportiert werden, um das Verflüchtigen des Acetaldehyds weitgehend zu verhindern.
3. Der ACH-Gehalt im Plasma kann mit unserer Methode zuverlässig bestimmt werden. Allerdings sollte die Bindung des Acetaldehyds an Plasmaproteine und die Reaktion des Acetaldehyds mit niedermolekularen Stoffen bei den jeweiligen Probanden durch Zusatzversuche bestimmt werden, und als Korrekturfaktoren mit in die Berechnung eingehen.

Mit diesen Vorschlägen kann nach unserer Ansicht ein Beitrag zur Verbesserung und Standardisierung des ACH-Nachweises im menschlichen Blut geleistet werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Abfall niedriger ACH-Anfangskonzentrationen im menschlichen Blut mit einer gaschromatographischen Methode untersucht.

Im Vollblut von sechs Versuchspersonen, dem 11,15 µg/ml Acetaldehyd zugesetzt wurde, fanden wir eine Abbaurrate von maximal 0,154 µg/ml/min. In den Erythrozyten-suspensionen ermittelten wir eine Abbaurrate von maximal 0,095 µg/ml/min. Der Zusatz von 11,15 µg/ml ACH zum Hämolysat ergab eine maximale Abbaurrate von 0,030 µg/ml/min. Im Dialyse-Hämolysat betrug sie maximal 0,019 µg/ml/min. Nach der NAD-Zugabe zum Dialyse-Hämolysat ermittelten wir eine maximale ACH-Abbaurrate von 0,085 µg/ml/min. Die Disulfiramzugabe bewirkte eine Abnahme der Abbaurrate auf maximal 0,024 µg/ml/min.

Im menschlichen Plasma ermittelten wir bei einer ACH-Anfangskonzentration von 11,15 µg/ml eine maximale Abbaurrate von 0,045 µg/ml/min vor der Dialyse und von maximal 0,021 µg/ml/min nach der Dialyse der Plasmaproben.

Damit konnten wir mit unserer gaschromatographischen Methode und bei den verwendeten niedrigen ACH-Anfangskonzentrationen die Ergebnisse vorausgehender Arbeiten bestätigen (18, 32) und zeigen, daß das Enzym ALDH in den Erythrozyten lokalisiert ist, NAD abhängig ist und durch Disulfiram gehemmt werden kann.

F. ANHANG

Die folgenden Tabellen enthalten eine Zusammenstellung der gemessenen ACH-Konzentrationen.

Die Konzentrationen wurden sowohl in ACH $\mu\text{g/ml}$, in ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$ angegeben um eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Literaturangaben zu erreichen. Außerdem wird der Hb-Gehalt der jeweiligen Proben angegeben.

Tab. Ia - If: Vollblut ACH-Konzentration bei den einzelnen Versuchspersonen in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$:

Tab. Ia: Vollblut Versuchsperson G.H.; Hb : 15,00 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	76,51	1,74
45	2,50	16,60	0,38
65	2,02	13,42	0,30
85	0,88	5,82	0,13
105	0,83	5,50	0,12
125	0,74	4,91	0,11
145	0,28	1,85	0,04
165	0,29	1,91	0,04

Tab. Ib: Vollblut Versuchsperson M.D.; Hb : 15,80 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	70,40	1,60
45	5,02	31,70	0,72
65	3,65	23,04	0,52
85	2,83	17,90	0,41
105	2,35	14,85	0,34
125	2,05	12,93	0,30
145	1,80	11,36	0,26
165	1,80	11,36	0,26

Tab. Ic: Vollblut Versuchsperson S.S.; Hb : 12,90 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	86,41	1,96
45	5,54	42,98	0,98
65	4,07	31,53	0,72
85	3,73	28,89	0,66
105	2,73	21,22	0,48
125	2,47	19,11	0,43
145	2,33	18,08	0,41
165	1,76	13,62	0,31

Tab. Id: Vollblut Versuchsperson J.S.; Hb : 14,057 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	79,32	1,80
45	4,89	34,77	0,79
65	3,71	26,42	0,60
85	2,86	20,38	0,46
105	2,34	16,65	0,38
125	1,82	12,98	0,29
145	1,88	13,37	0,30
165	1,59	11,31	0,29

Tab. Ie: Vollblut Versuchsperson H.L.; Hb : 13,40 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	59,63	1,36
45	3,66	19,89	0,45
65	2,76	14,97	0,34
85	1,99	10,76	0,24
105	1,80	9,78	0,22
125	1,64	8,91	0,20
145	1,21	6,52	0,15
165	1,45	7,81	0,18

Tab. If: Vollblut Versuchsperson P.S.; Hb : 16,05 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	69,44	1,58
45	3,58	22,30	0,51
65	3,21	19,99	0,45
85	2,38	14,83	0,34
105	1,81	11,29	0,26
125	1,61	9,99	0,23
145	1,44	8,95	0,20
165	1,34	8,32	0,19

Tab. IIa - IIc: Erythrozyten: ACH-Konzentration bei den einzelnen Versuchspersonen in und des Poolblutes in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$:

Tab. IIa: Erythrozyten Versuchsperson G.H.; Hb : 6,29 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	175,68	3,99
50	-	-	-
70	-	-	-
90	3,78	60,09	1,37
110	3,76	59,85	1,36
130	2,60	41,29	0,94
150	1,66	26,43	0,60

Tab. IIb: Erythrozyten Versuchsperson S.S.; Hb : 4,56 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	244,29	5,55
50	7,29	159,75	3,63
70	6,31	138,22	3,14
90	5,37	117,57	2,67
110	4,85	106,20	2,41
130	-	-	-
150	3,67	80,31	1,83
170	2,96	64,95	1,48

Tab. IIc: Erythrozyten Versuchsperson M.D.; Hb : 7,59 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	146,85	3,34
50	5,70	75,64	1,71
70	4,61	60,71	1,38
90	3,76	49,49	1,12
110	3,15	41,47	0,94
130	2,50	32,94	0,75
150	1,93	25,42	0,58
170	1,42	18,73	0,43

Tab. IIId: Erythrozyten Versuchsperson J.S.; Hb : 5,17 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	215,417	4,89
50	7,12	137,58	3,13
70	5,87	133,36	2,58
90	5,21	100,67	2,29
110	4,65	89,88	2,04
130	4,03	77,94	1,77
150	3,17	61,31	1,39
170	2,52	48,61	1,10

Tab. IIe: Erythrozyten Versuchsperson H.L.; Hb : 6,80 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	163,78	3,72
50	5,99	88,04	2,00
70	4,90	71,91	1,63
90	3,93	57,68	1,31
110	3,57	52,45	1,19
130	2,64	38,77	0,88
150	2,48	36,46	0,83
170	1,78	26,19	0,60

Tab. II f: Erythrozyten Versuchsperson P.S.; Hb : 4,85 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	229,89	5,22
50	5,87	120,97	2,75
70	4,60	94,92	2,16
90	3,89	80,13	1,82
110	3,28	67,63	1,54
130	2,96	61,73	1,39
150	2,50	51,52	1,17
170	1,83	37,73	0,86

Tab. IIg: Erythrozyten Blutbankblut, Hb : 6,611 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	169,67	3,85
50	9,33	141,65	3,22
70	8,577	129,90	2,95
90	7,98	120,82	2,74
110	7,81	118,33	2,69
130	7,59	114,95	2,61
150	6,93	104,93	2,38
170	5,10	102,40	2,32

Tab. IIIa - IIIf: Hämolysat: ACH-Konzentration bei den einzelnen Versuchspersonen in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$:

Tab. IIIa: Hämolysat Versuchsperson G.H.; Hb : 4,12 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	265,79	6,23
55	9,23	220,04	5,00
75	9,86	234,96	5,34
95	8,85	211,31	4,80
115	8,87	211,39	4,80
135	9,09	216,67	4,92
155	8,45	201,52	4,58
175	8,12	193,61	4,40

Tab. IIIb: Hämolysat Versuchsperson S.S.; Hb : 4,32 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	258,23	5,87
55	10,20	236,23	5,37
75	10,51	243,39	5,53
95	-	-	-
115	9,74	225,57	5,13
135	9,63	222,96	5,07
155	9,65	223,51	5,08
175	9,27	214,60	4,88

Tab. IIIC: Hämolysat Versuchsperson M.D.; Hb : 7,06 g/100ml

Zeit (min)	ACH µg/ml	ACH µg/gHb	ACH µM/gHb
0	11,15	157,88	3,59
55	9,91	140,28	3,19
75	9,55	135,21	3,07
95	9,22	130,57	2,97
115	9,15	129,57	2,94
135	9,08	128,55	2,92
155	8,76	124,00	2,82
175	8,65	122,45	2,78

Tab. IIId: Hämolysat Versuchsperson J.S.; Hb : 5,41 g/100ml

Zeit (min)	ACH µg/ml	ACH µg/gHb	ACH µM/gHb
0	11,15	206,14	4,68
55	9,80	181,15	4,12
75	9,80	181,33	4,12
95	9,79	180,99	4,11
115	9,74	180,66	4,09
135	9,42	174,19	3,96
155	9,23	170,67	3,88
175	8,86	163,86	3,72

Tab. IIIe: Hämolysat Versuchsperson H.L.; Hb : 6,68 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	166,92	3,79
55	8,89	133,18	3,03
75	8,60	128,68	2,92
95	7,67	114,87	2,61
115	7,93	118,64	2,70
135	8,68	129,94	2,95
155	6,94	103,91	2,36
175	7,06	105,67	2,40

Tab. IIIf: Hämolysat Versuchsperson P.S.; Hb : 6,10 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	182,89	4,16
55	9,10	149,20	3,39
75	9,37	153,66	3,49
95	8,59	140,93	3,20
115	8,65	141,83	3,22
135	7,79	127,83	2,90
155	7,90	129,60	2,95
175	7,75	127,15	2,89

Tab. IVa - IVe: Dialysehämolysat: ACH-Konzentration bei den einzelnen Versuchspersonen in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$:

Tab. IVa: Dialysehämolysat Versuchsperson S.S.; Hb : 4,31 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	258,23	5,87
55	9,31	215,58	4,90
75	9,00	208,60	4,74
95	8,07	186,97	4,25
115	7,95	184,11	4,18
135	8,00	185,22	4,10
155	7,92	183,45	4,17
175	7,87	182,21	4,14

Tab. IVb: Dialysehämolysat Versuchsperson M.D.; Hb : 6,13 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	181,80	4,13
55	9,57	156,04	3,55
75	9,66	157,58	3,58
95	9,35	152,47	3,47
115	9,45	154,04	3,50
135	9,34	152,33	3,46
155	9,61	156,72	3,56
175	9,54	155,49	3,53

Tab. IVc: Dialysehämolysat Versuchsperson J.S.; Hb: 4,87 g/100 ml

0	11,15	228,96	5,20
55	9,44	193,78	4,40
75	-	-	-
95	9,23	189,46	4,31
115	9,02	185,32	4,21
135	9,48	194,75	4,43
155	9,11	187,10	4,25

Tab. IVd: Dialysehämolysat Versuchsperson H.L.; Hb : 6,72 g/100ml

Zeit (min)	ACH µg/ml	ACH µg/gHb	ACH µM/gHb
0	11,15	160,02	3,77
55	11,02	164,05	3,73
75	9,79	145,71	3,31
95	9,58	142,63	3,24
115	11,40	169,69	3,86
135	9,06	134,96	3,07
155	9,84	146,46	3,33
175	9,43	140,39	3,19

Tab. IVe: Dialysehämolysat Versuchsperson P.S.; Hb : 6,10 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	182,89	4,16
55	11,14	182,72	4,15
75	10,06	165,08	3,75
95	10,01	164,16	3,73
115	9,88	161,98	3,68
135	9,37	153,71	3,49
155	9,48	155,52	3,53
175	9,36	153,52	3,49

Tab. Va - Ve: Dialyse-Hämolysat: ACH-Konzentration bei den einzelnen Versuchspersonen in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$:
nach NAD-Zusatz

Tab. Va: Dialysehämolysat nach NAD-Zusatz Versuchsperson S.S.;
Hb : 4,31 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	258,23	5,87
50	6,79	157,17	3,57
70	4,94	114,38	2,60
90	5,56	128,75	2,93
110	4,64	107,42	2,44
130	4,00	92,62	2,10
150	3,70	85,68	1,95
170	3,58	82,93	1,88

Tab. Vb: Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zusatz Versuchsperson M.D.;
Hb : 6,13 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	181,80	4,14
50	7,14	116,47	2,65
70	6,13	99,95	2,27
90	5,56	90,60	2,06
110	5,21	84,98	1,93
130	-	-	-
150	4,60	75,06	1,71
170	4,52	73,68	1,67

Tab. Vc: Dialysehämolysat nach NAD-Zusatz Versuchsperson J.S.;
Hb : 4,87 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	228,96	5,20
50	6,39	131,31	2,98
70	5,15	105,67	2,40
90	4,15	85,22	1,94
110	4,04	82,92	1,88
130	3,80	78,10	1,78
150	3,57	73,30	1,66

Tab. Vd: Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zusatz Versuchsperson H.L.;
Hb : 6,72 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	166,02	3,77
50	7,19	107,13	2,43
70	6,69	99,68	2,27
90	5,61	83,52	1,90
110	5,16	76,87	1,75
130	4,78	71,18	1,62
150	4,54	67,58	1,54
170	4,39	65,36	1,49

Tab. Ve: Dialyse-Hämolysat nach NAD-Zusatz

Versuchsperson P.S.;

Hb : 6,10 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	182,89	4,16
50	7,01	115,05	2,61
70	5,24	85,90	1,95
90	4,69	76,99	1,75
110	5,34	71,22	1,62
130	4,16	68,26	1,55
150	3,92	64,28	1,46
170	3,89	63,78	1,45

Tab. VIa - VIb: Dialyse-Hämolysat nach NAD und Disulfiramzusatz
 ACH-Konzentration bei den einzelnen Versuchspersonen in
 ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$:

Tab. VIa: Dialysehämolysat nach NAD- und Disulfiramzusatz;
Versuchsperson J.S.; Hb : 4,87 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	228,96	5,20
50	10,20	209,52	4,76
70	10,40	213,58	4,85
90	9,74	200,03	4,55
110	8,83	181,28	4,12
130	8,44	173,45	3,94
150	8,90	182,84	4,16
170	10,02	205,70	4,68

Tab. VIb: Dialyse-Hämolysat nach NAD-und Disulfiramzusatz;
Versuchsperson H.L.; Hb : 6,72 g/100ml

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$	ACH $\mu\text{g/gHb}$	ACH $\mu\text{M/gHb}$
0	11,15	166,02	3,77
50	10,29	153,21	3,48
70	10,15	151,18	3,44
90	9,69	144,22	3,28
110	-	-	-
130	9,64	143,60	3,26
150	9,78	145,62	3,31

Tab. VIIa - VIIf: Plasma; ACH-Konzentration bei den einzelnen Versuchspersonen in ACH $\mu\text{g/ml}$, ACH $\mu\text{g/gHb}$ und ACH $\mu\text{M/gHb}$:

Tab. VIIa: Plasma; Versuchsperson G.H.;

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$
0	11,15
40	7,54
60	7,17
80	6,69
100	6,58
120	6,02
140	6,09
160	5,46

Tab. VIIb: Plasma; Versuchsperson S.S.

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$
0	11,15
40	10,54
60	9,85
80	9,57
100	9,64
120	8,67
140	8,66
160	8,53

Tab. VIIc: Plasma; Versuchsperson M.D.

Zeit (min)	ACH µg/ml
0	11,15
40	10,45
60	9,86
80	9,23
100	8,94
120	8,56
140	8,65
160	7,19

Tab. VIId: Plasma; Versuchsperson J.S.

Zeit (min)	ACH µg/ml
0	11,15
40	9,43
60	9,14
80	8,75
100	8,38
120	7,83
140	7,74
160	7,25

Tab. VIIe: Plasma; Versuchsperson H.L.

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$
0	11,15
40	9,27
60	8,92
80	8,37
100	8,19
120	7,81
140	7,57

Tab. VIIIf: Plasma; Versuchsperson P.S.

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$
0	11,15
40	9,32
60	8,88
80	8,39
100	8,18
120	7,77
140	7,54
160	7,27

Tab. VIIla - VIIle: Dialyse-Plasma;

ACH-Konzentration bei den einzelnen
Versuchspersonen in ACH µg/ml

Tab. VIIla:

Dialyse-Plasma;

Versuchsperson S.S.

Zeit (min)	ACH µg/ml
0	11,15
40	10,44
60	-
80	9,35
100	9,03
120	8,95
140	9,25
160	8,55

Tab. VIIlb:

Dialyse-Plasma;

Versuchsperson M.D.

Zeit (min)	ACH µg/ml
0	11,15
40	-
60	9,77
80	9,62
100	9,06
120	9,82
140	9,51
160	9,72

Tab. VIIId: Dialyse-Plasma; Versuchsperson J.S.

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$
0	11,15
40	10,23
60	9,88
80	10,00
100	9,70
120	9,99
140	8,89
160	8,65

Tab. VIIId: Dialyse-Plasma; Versuchsperson H.L.

Zeit (min)	ACH $\mu\text{g/ml}$
0	11,15
40	10,30
60	10,13
80	9,50
100	10,32
120	9,54
140	9,52
160	9,11

Tab. VIIIe: Dialyse-Plasma; Versuchsperson P.S.

Zeit (min)	ACH µg/ml
0	11,15
40	10,34
60	9,96
80	9,35
100	-
120	8,73
140	8,97
160	9,01

G. LITERATUR

- (1) ALSEN, C.:
Neuere Forschungsergebnisse über die Toxikologie des Alkohols.
Suchtgefahren, 22, (1976), 61-69

- (2) BALTHAZARD, M. LAMBERT:
Recherches toxicologiques sur l'alcoholisme aigu chez l'homme.
Ann. Med. lég. 1, (1921), 83

- (3) BURBRIDGE, T.N., HINE, C.N., and SCHICK, A.F.
J. Lab. Clin. Med. 35, (1950) 985 - 987
zit. nach Erikson et al (1977).

- (4) CASIER, H. and POLET, H.
Arch Int. Pharmacodyn. Ther. 113, (1958), 439 - 496
zit. nach Erikson et al. (1977)

- (5) CEDERBAUM, A.J., LIEBER, Ch., RUBIN, E.:
Effect of Acetaldehyde on Fatty-Acid-Oxidation and Ketogenesis by
Hepatic Mitochondria.
Arch. Biochem. Biophys. 169, (1975), 29-41

- (6) DEITRICH, R.A., ERWIN, V.G.:
Mechanism of the inhibition of Acetaldehyde dehydrogenase in vivo by
disulfiram and diethyldithiocarbamate.
Molecular Pharmacology J., 7, (1970), 301 - 307,

- (7) DURITZ, G., and TRUITT, E.B.:
A rapid method for simultaneous determination of acetaldehyde and
ethanol in blood using gas-chromatography.
Q.J. Stud. Alcohol, 25, (1964), 498 - 510

- (8) ERIKSON, C.J.
Problems and Pitfalls in ACH-Determinations.
Alcoholism: Clinical and Experimental Research Vol. 4 Nr. 1,
Grune u. Strutton, Inc., (1980), 22 - 29
- (9) ERIKSSON, C.J., W. SIPPEL and OLOF A. FORSANDER.
The determination of Acetaldehyde in biological samples by Head-Space
Gas chromatography.
Analytical Biochemistry 80, (1977), 116 - 124
- (10) FABRE, M.:
Contribution a` l` étude de l`aldèhyde contenue dans le sang.
Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 7, (1925), 429
- (11) FEUERLEIN, W.:
Alkoholismus-Mißbrauch und Abhängigkeit,
2. Auflage Thieme Verlag, Stuttgart, (1979), S. 17
- (12) FEUERLEIN, W.:
Alkoholismus-Mißbrauch und Abhängigkeit,
2. Auflage Thieme Verlag, Stuttgart, (1979), S. 31
- (13) FORTH, W., HENSCHLER, D., D. RUMMEL, W.:
Pharmakologie und Toxikologie
B.I.-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich,
2. Auflage, (1977) S. 619
- (14) GOEDDE, H.W., HARADA, S., AGARWAL, D.P.:
Racial differences in alcohol sensitivity: a new hypotheses.
Humangenetik 51, (1979), 331 - 334
- (15) HARADA, S., AGARWAL, D.P., GOEDDE, H.W.:
Isoenzyme variations of acetaldehyde dehydrogenase in human tissues.
Human Genetics 44, (1978), 181 - 185

- (16) HARADA, S., AGARWAL, D.P., GOEDDE, H.W.:
Electrophoretic and biochemical studies of human aldehyde dehydrogenase isoenzymes in various tissues
Life Sci. 26, (1980), 1773 - 1780,
- (17) HARADA, S., MISAWA, S., AGARWAL, D.H., GOEDDE, H.W.:
Liver Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase in the Japanese: Isoenzyme Variation and its possible Role in Alcohol Intoxication.
Am.J.Hum.Gen. 32, (1980), 8 - 15,
- (18) INOUE, K., NISHIMUI, H., YAMASAWA, K.:
Metabolism of Acetaldehyde by Human Erythrocytes.
Life Sci., 23, (1978), 179 - 184
- (19) HOLSTMAN, S.G., SCHNEIDER, F.H.:
Comparison of Acetaldehyde and Ethanol: Depression of Motor Activity in Mice
Life Sci. 14, (1974), 1243 - 1250,
- (20) KORSTEN, M.A., MATSUZAKI, S., FEINMAN L., and LIEBER
High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. Differences between alcoholic and non alcoholic subjects.
N. Engl. J. Med., 292, (1975), 386 - 389
- (21) LIEBER, C.S., DE CHARLI, L.M., FEINMAN, L., HASUMARA, Y., KARSTEN, M., MATSUZAKI, S.:
Effects of chronic Alcohol Consumption on Ethanol- and Acetaldehyde-Metabolism.
Adv. Exp. Med. Bio. 59, (1975), 185 - 227
- (22) LIEBER, C.H.:
Metabolism of Alcohol
Scientific American 234 Nr. 3, (1976), 3 - 12
- (23) LUNDQUIST, F.:
Biochem. J. 68, (1958), 172 - 177
zit. nach Erikson et al. (1977)

- (24) SAUTER, A.M., BOSS, D., V. WARTBURG, J.P.:
Reevaluation of the Disulfiramalcohol-Reaction in Man.
Journal of Studies on Alcohol 38, (1977), 1680 - 1695
- (25) SCHÖNIGER, P.:
Versuche zum Verhalten des Acetaldehyds im menschlichen Blut mittels
zweier gaschromatographischer Methoden.
Dissertation am Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-
Nürnberg. In Vorbereitung.
- (26) SCHUCKIT, M.A., and RAYSES, V.:
Ethanol ingestion: Differences in blood acetaldehyde-concentrations
in relatives of alcoholics and controls
Science: 203, (1979), 54 - 55
- (27) SKELTON, F.R., H.M. CONKEY u. G.A. GRANT:
Synergistic action of antabuse and intravenous cyanamide and blood
acetaldehyde following alcoholic administration.
Canad. J. med. Sci. 30, (1952), 151
- (28) STEPP, W.:
Über das Auftreten von Acetaldehyd im Körper beim Abbau des Äthyl-
alkohols.
Arch. exp. Path. Pharmac. 87, (1920), 148
- (29) STOTZ, E.A.:
J. L. Biol. Chem. 148, (1943), 585 - 591
zit. nach Erikson et al. (1977)
- (30) STOWELL, A., GREENWAY, R.M., BATT, R.D.:
Acetaldehyde Formation during Deproteinization of Human Blood
Samples Containing Ethanol.
Biochemical Medicine 18, (1977), 392 - 401

(31) SUPNIEWSKI, J.V.:

The influence of insulin on the acetaldehydes formation in the body of animals.

J. Biol. Chem. 70, (1926), 13

(32) WARTBURG, J.P.:

Acetaldehyde Psychopharmacology of Alcohol.

Raven Press, New York, (1980), 137 - 146

An dieser Stelle möchte ich dem Direktor des Institutes für Rechtsmedizin, Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling, für die Möglichkeit an seinem Institut arbeiten zu können, meinen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. G. Machbert danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas und seine tatkräftige und stets gerne gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch meiner Schwester für das Schreiben des Manuskriptes.

Lebenslauf

Am 27.10.1954 wurde ich als erstes Kind der Eheleute Oskar Schleicher und Johanna Schleicher, geb. Schiller in Ebern geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule Schwarzenbruck und anschließend bis 1975 das Leibniz-Gymnasium Altdorf.

Nach dem Abitur 1975 absolvierte ich eine Ausbildung als nebenamtlicher Kirchenmusiker am Institut für Kirchenmusik der Universität Erlangen-Nürnberg.

1976 begann ich das Studium der Psychologie (Vordiplom 1979) an der Universität Erlangen-Nürnberg.

1977 immatrikulierte ich mich im Studienfach Humanmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg.

Im März 1979 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im März 1980 den 1. Teil des Staatsexamens, im März 1982 den 2. Teil des Staatsexamens und im April 1983 den 3. Teil des Staatsexamens.

Seit 01. Juni 1983 bin ich als chirurgischer Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Hersbruck angestellt.

Druck: Offsetdruckerei Karl Döres, 8520 Erlangen, Jägerstr. 3, Inh. B. Lengenfelder